(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-525304
(P2023-525304A)
(43)公表日　令和5年6月15日(2023.6.15)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/09 (2006.01)		C12N	15/09	110	4B065
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	ZZNA	4C084
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		4C087
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全737頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-567857(P2022-567857)
(86)(22)出願日　令和3年5月7日(2021.5.7)
(85)翻訳文提出日　令和5年1月10日(2023.1.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/031439
(87)国際公開番号　WO2021/226558
(87)国際公開日　令和3年11月11日(2021.11.11)
(31)優先権主張番号　63/022,397
(32)優先日　令和2年5月8日(2020.5.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/116,785
(32)優先日　令和2年11月20日(2020.11.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　515025398
ザ ブロード インスティテュート，インコーポレーテッド
ＴＨＥ ＢＲＯＡＤ ＩＮＳＴＩＴＵＴＥ，ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、ルーム ７００３
４１５ Ｍａｉｎ Ｓｔｒｅｅｔ，Ｒｏｏｍ ７００３，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ ０２１４２
Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ ｏｆ Ａｍｅｒｉｃａ
(71)出願人　507044516
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】　標的二本鎖ヌクレオチド配列の両鎖同時編集のための方法および組成物

(57)【要約】
本開示は、編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステム、組成物、および方法を提供する。いくつかの側面において、システムは第1および第2のプライム編集因子複合体を含み、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれは(1)(i)核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および(ii)RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを含むプライム編集因子と;(2)スペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含むpegRNAとを含み、DNA合成鋳型は所望のDNA配列またはその相補物をコードし、所望のDNA配列およびその相補物は、編集された部分を含む二重鎖を形成し、これが編集されるべき標的部位に取り入れられる。いくつかの側面において、システムは、それぞれがプライム編集因子とPEgRNAとを含む第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子複合体を含む。編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するための方法もまた提供される。本願においては、さらに、医薬組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、およびキットが提

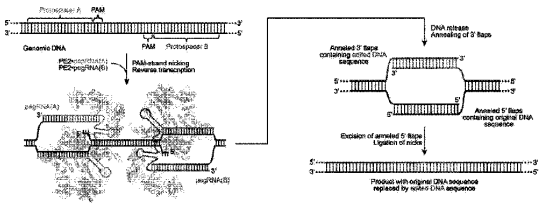


FIG. 90

【特許請求の範囲】
【請求項１】
システムが、第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体を含み、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれは、(1)(i)核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および(ii)RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを含むプライム編集因子と;(2)スペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含むpegRNAとを含み、第1のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型は第1の一本鎖DNA配列をコードし、第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型は第2の一本鎖DNA配列をコードし、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列は、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含み、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列は、編集されるべき標的部位のDNA配列と比較して編集された部分を含む二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられる、編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステム。
【請求項２】
第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である、請求項1に記載のシステム。
【請求項３】
第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が同じプライム編集因子を含む、請求項1または2に記載のシステム。
【請求項４】
第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が異なるプライム編集因子を含む、請求項1または2に記載のシステム。
【請求項５】
napDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである、請求項1～4のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項６】
napDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、Cas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである、請求項1～5のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項７】
napDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、CasX、CasY、およびアルゴノートからなる群から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項８】
napDNAbpがニッカーゼ活性を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項９】
napDNAbpが、配列番号18～88のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号18～88のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１０】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドが逆転写酵素である、請求項1～9のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１１】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドが、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、および700～766のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%

の配列同一性を配列番号89～100、105～122、128～129、および132のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項1～10のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１２】
プライム編集因子が、さらに、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを連結するリンカーを含む、請求項1～11のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１３】
リンカーが、配列番号166～177のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号166～177のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項12に記載のシステム。
【請求項１４】
リンカーが、長さが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アミノ酸である、請求項12または13に記載のシステム。
【請求項１５】
pegRNAが、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む、請求項1～14のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１６】
第1のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する、請求項1～15のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１７】
第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する、請求項1～16のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１８】
それによって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列の結合が、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれのnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項17に記載のシステム。
【請求項１９】
第1および第2の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める、請求項18に記載のシステム。
【請求項２０】
第1および第2の結合部位の間の一続きの領域が、長さが少なくとも10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44

ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項19に記載のシステム。

【請求項２１】

一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる、請求項19に記載のシステム。

【請求項２２】

DNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、

少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項1～21のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項２３】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する、請求項1～22のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項２４】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する、請求項1～22のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項２５】

相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99％、少なくとも95％、少なくとも90％、少なくとも85％、少なくとも80％、少なくとも75％、少なくとも70％、少なくとも65％、少なくとも60％、少なくとも55％、少なくとも50％、少なくとも45％、少なくとも40％、少なくとも35％、少なくとも30％、少なくとも25％、少なくとも20％、少なくとも15％、または少なくとも10％である、請求項1～24のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項２６】

相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、

少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドであり、所望のDNA配列およびその相補物の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである、請求項25に記載のシステム。

【請求項２７】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、編集された部分を含む二重鎖を形成する、請求項25に記載のシステム。

【請求項２８】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である、請求項1～27のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項２９】

編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項21に記載のシステム。

【請求項３０】

システムが:

a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

を含み、

第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、二本鎖DNA配列の第1鎖および第2鎖が互いに対して相補的である、

編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステム。

【請求項３１】

第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク

質である、請求項30に記載のシステム。
【請求項３２】
第1および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む、請求項30に記載のシステム。
【請求項３３】
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、編集された部分を含む二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられる、請求項30に記載のシステム。
【請求項３４】
第1の一本鎖DNA配列および/または第2の一本鎖配列が、標的部位のDNA配列と比較して配列相同性を含まない、請求項30に記載のシステム。
【請求項３５】
第1のPEgRNAが、さらに、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、および第1のプライマー結合部位を含み、第2のPEgRNAが、さらに、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、および第2のプライマー結合部位を含む、請求項30に記載のシステム。
【請求項３６】
第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む、請求項30～35のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項３７】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドが同じである、請求項30～36のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項３８】
第1および/または第2のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである、請求項30～37のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項３９】
第1および/または第2のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、Cas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである、請求項30～38のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４０】
第1および/または第2のnapDNAbpが、Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、CasX、CasY、およびアルゴノートからなる群から選択される、請求項30～39のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４１】
napDNAbpがニッカーゼ活性を有する、請求項30～40のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４２】
第1および/または第2のnapDNAbpが、配列番号18～88のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号18～88のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項30～41のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４３】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが逆転写酵素である、請求項30～42のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４４】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、および700～766のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号89～100、105～122、128～129、および132のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項30～43のい

ずれか1項に記載のシステム。
【請求項４５】
第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;および/または第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含む、請求項30～44のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４６】
リンカーが、配列番号166～177のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号166～177のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項45に記載のシステム。
【請求項４７】
リンカーが、長さが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アミノ酸である、請求項45に記載のシステム。
【請求項４８】
第1および/または第2のpegRNAが、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む、請求項30～47のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項４９】
第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する、請求項30～48のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項５０】
第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する、請求項35に記載のシステム。
【請求項５１】
それによって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれの第1および/または第2のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項35に記載のシステム。
【請求項５２】
第1および第2の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める、請求項30に記載のシステム。
【請求項５３】
第1および第2の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレ

オチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項52に記載のシステム。

【請求項５４】

一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる、請求項52に記載のシステム。

【請求項５５】

第1および/または第2のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも

61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項30～54のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項５６】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する、請求項30～55のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項５７】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する、請求項30～56のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項５８】

相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、少なくとも15%、または少なくとも10%である、請求項30～57のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項５９】

相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少

なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項30～58のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項６０】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する、請求項30～59のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項６１】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である、請求項30～60のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項６２】

編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項54に記載のシステム。

【請求項６３】

請求項1～62のいずれか1項に記載のシステムをコードするポリヌクレオチド。

【請求項６４】

請求項1～62のいずれか1項に記載の第1および第2のプライム編集因子をコードするポリヌクレオチド。

【請求項６５】

請求項1～62のいずれか1項に記載の第1および/または第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

【請求項６６】

請求項30～62のいずれか1項に記載の第1および/または第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

【請求項６７】

請求項1～29のいずれか1項に記載の第1および第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

【請求項６８】

請求項30～62のいずれか1項に記載の第1および第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

【請求項６９】

請求項63～68のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項７０】

請求項63～68のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項69に記載のベク

ターを含む細胞。
【請求項７１】
請求項63～68のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド、請求項69に記載のベクター、または請求項70に記載の細胞、および医薬賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項７２】
請求項63～68のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項69に記載のベクター、および編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するための説明書を含む、キット。
【請求項７３】
方法が、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、前記のペアが:
a．i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および
ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、
を含む第1のプライム編集因子複合体;
b．i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体、
を含み;
第1のプライム編集因子複合体が、第1の結合部位に対して相補的な配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第2のプライム編集因子複合体が、第2の結合部位に対して相補的な配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、編集を含む二重鎖を形成し;
二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換える、
標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法。
【請求項７４】
第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である、請求項73に記載の方法。
【請求項７５】
第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む、請求項73に記載の方法。
【請求項７６】
第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が、異なるプライム編集因子を含む、請求項73に記載の方法。
【請求項７７】
第1および/または第2のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである、請求項73～76のいずれか1項に記載の方法。
【請求項７８】
第1および/または第2のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレア

ーゼ不活性型Cas9ドメイン、Cas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである、請求項73～77のいずれか1項に記載の方法。

【請求項７９】

第1および/または第2のnapDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、CasX、CasY、およびアルゴノートからなる群から選択される、請求項73～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８０】

第1および/または第2のnapDNAbpがニッカーゼ活性を有する、請求項73～79のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８１】

第1および/または第2のnapDNAbpが、配列番号18～88のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号18～88のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項73～80のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８２】

RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが逆転写酵素である、請求項73～81のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８３】

RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、および700～766のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号89～100、105～122、128～129、および132のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項73～82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８４】

第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み、および/または第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含む、請求項73～83のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８５】

リンカーが、配列番号166～177のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号166～177のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項84に記載の方法。

【請求項８６】

リンカーが、長さが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アミノ酸である、請求項84または85に記載の方法。

【請求項８７】

第1および/または第2のpegRNAが、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む、請求項73～86のいずれか1項に記載の方法。

【請求項８８】

第1および/または第2のPEgRNAが、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌ

クレオチド配列を含む、請求項７３～８７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８９】
第１のプライム編集因子複合体の第１のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖ＤＮＡ配列の第１鎖上の第１の結合部位に結合する、請求項７３～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
第２のプライム編集因子複合体の第２のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖ＤＮＡ配列の第２鎖上の第２の結合部位に結合する、請求項７３～８９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９１】
ＰＡＭ配列の存在下における第１および第２のプライム編集因子複合体の第１および第２のスペーサー配列の結合が、各第１および第２のプライム編集因子複合体のｎａｐＤＮＡｂｐによって、各鎖上のＰＡＭ配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第１および第２鎖のニック入れをもたらす、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
第１および第２の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖ＤＮＡの一続きの領域の２つの端を定める、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
第１および第２の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の１０核酸塩基対、少なくとも１１核酸塩基対、少なくとも１２核酸塩基対、少なくとも１３核酸塩基対、少なくとも１４核酸塩基対、少なくとも１５核酸塩基対、少なくとも１６核酸塩基対、少なくとも１７核酸塩基対、少なくとも１８核酸塩基対、少なくとも１９核酸塩基対、少なくとも２０核酸塩基対、少なくとも２１核酸塩基対、少なくとも２２核酸塩基対、少なくとも２３核酸塩基対、少なくとも２４核酸塩基対、少なくとも２５核酸塩基対、少なくとも２６核酸塩基対、少なくとも２７核酸塩基対、少なくとも２８核酸塩基対、少なくとも２９核酸塩基対、少なくとも３０核酸塩基対、少なくとも３１核酸塩基対、少なくとも３２核酸塩基対、少なくとも３３核酸塩基対、少なくとも３４核酸塩基対、少なくとも３５核酸塩基対、少なくとも３６核酸塩基対、少なくとも３７核酸塩基対、少なくとも３７核酸塩基対、少なくとも３８核酸塩基対、少なくとも３９核酸塩基対、または少なくとも４０核酸塩基対、少なくとも４１ヌクレオチド、少なくとも４２ヌクレオチド、少なくとも４３ヌクレオチド、少なくとも４４ヌクレオチド、少なくとも４５ヌクレオチド、少なくとも４６ヌクレオチド、少なくとも４７ヌクレオチド、少なくとも４８ヌクレオチド、少なくとも４９ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも５１ヌクレオチド、少なくとも５２ヌクレオチド、少なくとも５３ヌクレオチド、少なくとも５４ヌクレオチド、少なくとも５５ヌクレオチド、少なくとも５６ヌクレオチド、少なくとも５７ヌクレオチド、少なくとも５８ヌクレオチド、少なくとも５９ヌクレオチド、少なくとも６０ヌクレオチド、少なくとも６１ヌクレオチド、少なくとも６２ヌクレオチド、少なくとも６３ヌクレオチド、少なくとも６４ヌクレオチド、少なくとも６５ヌクレオチド、少なくとも６６ヌクレオチド、少なくとも６７ヌクレオチド、少なくとも６８ヌクレオチド、少なくとも６９ヌクレオチド、少なくとも７０ヌクレオチド、少なくとも７１ヌクレオチド、少なくとも７２ヌクレオチド、少なくとも７３ヌクレオチド、少なくとも７４ヌクレオチド、少なくとも７５ヌクレオチド、少なくとも７６ヌクレオチド、少なくとも７７ヌクレオチド、少なくとも７８ヌクレオチド、少なくとも７９ヌクレオチド、少なくとも８０ヌクレオチド、少なくとも８１ヌクレオチド、少なくとも８２ヌクレオチド、少なくとも８３ヌクレオチド、少なくとも８４ヌクレオチド、少なくとも８５ヌクレオチド、少なくとも８６ヌクレオチド、少なくとも８７ヌクレオチド、少なくとも８８ヌクレオチド、少なくとも８９ヌクレオチド、少なくとも９０ヌクレオチド、少なくとも９１ヌクレオチド、少なくとも９２ヌクレオチド、少なくとも９３ヌクレオチド、少なくとも９４ヌクレオチド、少なくとも９５ヌクレオチド、少なくとも９６ヌクレオチド、少なくとも９７ヌクレオチド、少なくとも９８ヌクレオチド、少なくとも９９ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも１０１ヌクレオチド、少なくとも１０２ヌクレオチド、少

なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項92に記載の方法。

【請求項９４】

一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる、請求項92または93に記載の方法。

【請求項９５】

第1および/または第2のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項73～94のいずれか1項に記載の方法。

【請求項９６】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する、請求項73～95のいずれか1項に記載の方法。

【請求項９７】
第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第２の一本鎖ＤＮＡ配列が異なる長さを有する、請求項７３～９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
相補性の領域が、第１の一本鎖ＤＮＡ配列または第２の一本鎖ＤＮＡ配列の全長の少なくとも９９％、少なくとも９５％、少なくとも９０％、少なくとも８５％、少なくとも８０％、少なくとも７５％、少なくとも７０％、少なくとも６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％、少なくとも５０％、少なくとも４５％、少なくとも４０％、少なくとも３５％、少なくとも３０％、少なくとも２５％、少なくとも２０％、少なくとも１５％、または少なくとも１０％である、請求項７３～９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９９】
相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも２６ヌクレオチド、少なくとも２７ヌクレオチド、少なくとも２８ヌクレオチド、少なくとも２９ヌクレオチド、少なくとも３０ヌクレオチド、少なくとも３１ヌクレオチド、少なくとも３２ヌクレオチド、少なくとも３３ヌクレオチド、少なくとも３４ヌクレオチド、少なくとも３５ヌクレオチド、少なくとも３６ヌクレオチド、少なくとも３７ヌクレオチド、少なくとも３８ヌクレオチド、少なくとも３９ヌクレオチド、少なくとも４０ヌクレオチド、少なくとも４１ヌクレオチド、少なくとも４２ヌクレオチド、少なくとも４３ヌクレオチド、少なくとも４４ヌクレオチド、少なくとも４５ヌクレオチド、少なくとも４６ヌクレオチド、少なくとも４７ヌクレオチド、少なくとも４８ヌクレオチド、少なくとも４９ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも５１ヌクレオチド、少なくとも５２ヌクレオチド、少なくとも５３ヌクレオチド、少なくとも５４ヌクレオチド、少なくとも５５ヌクレオチド、少なくとも５６ヌクレオチド、少なくとも５７ヌクレオチド、少なくとも５８ヌクレオチド、少なくとも５９ヌクレオチド、少なくとも６０ヌクレオチド、少なくとも６１ヌクレオチド、少なくとも６２ヌクレオチド、少なくとも６３ヌクレオチド、少なくとも６４ヌクレオチド、少なくとも６５ヌクレオチド、少なくとも６６ヌクレオチド、少なくとも６７ヌクレオチド、少なくとも６８ヌクレオチド、少なくとも６９ヌクレオチド、少なくとも７０ヌクレオチド、少なくとも７１ヌクレオチド、少なくとも７２ヌクレオチド、少なくとも７３ヌクレオチド、少なくとも７４ヌクレオチド、少なくとも７５ヌクレオチド、少なくとも７６ヌクレオチド、少なくとも７７ヌクレオチド、少なくとも７８ヌクレオチド、少なくとも７９ヌクレオチド、少なくとも８０ヌクレオチド、少なくとも８１ヌクレオチド、少なくとも８２ヌクレオチド、少なくとも８３ヌクレオチド、少なくとも８４ヌクレオチド、少なくとも８５ヌクレオチド、少なくとも８６ヌクレオチド、少なくとも８７ヌクレオチド、少なくとも８８ヌクレオチド、少なくとも８９ヌクレオチド、少なくとも９０ヌクレオチド、少なくとも９１ヌクレオチド、少なくとも９２ヌクレオチド、少なくとも９３ヌクレオチド、少なくとも９４ヌクレオチド、少なくとも９５ヌクレオチド、少なくとも９６ヌクレオチド、少なくとも９７ヌクレオチド、少なくとも９８ヌクレオチド、少なくとも９９ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも１０１ヌクレオチド、少なくとも１０２ヌクレオチド、少なくとも１０３ヌクレオチド、少なくとも１０４ヌクレオチド、少なくとも１０５ヌクレオチド、少なくとも１０６ヌクレオチド、少なくとも１０７ヌクレオチド、少なくとも１０８ヌクレオチド、少なくとも１０９ヌクレオチド、または少なくとも１１０ヌクレオチドであり、所望のＤＮＡ配列およびその相補物の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである、請求項７３～９８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１００】
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する、請求項73～99のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０１】
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である、請求項73～100のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０２】
編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項94に記載の方法。
【請求項１０３】
二重鎖が、1以上のリコンビナーゼ部位を含む編集を含む、請求項73～102のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１０４】
さらに、編集されるべき標的部位のDNA配列のリコンビナーゼによって媒介される編集を促進するためのリコンビナーゼを提供することを含む、請求項103に記載の方法。
【請求項１０５】
ペアが:
a．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)であって、第1のPEgRNAが、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、第1のDNA合成鋳型、および第1のプライマー結合部位を含み、第1のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第1の一本鎖DNA配列をコードする;
b．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)であって、第2のPEgRNAが、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、第2のDNA合成鋳型、および第2のプライマー結合部位を含み、第2のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第2の一本鎖DNA配列をコードし、第2の一本鎖DNA配列が、第1の一本鎖DNA配列に対する相補性の領域を含む、
を含む、
二重プライム編集への使用のためのpegRNAのペア。
【請求項１０６】
第1のPEgRNAが、構造:
5'-[第1のgRNAスペーサー配列]-[第1のgRNAコア]-[第1のDNA合成鋳型]-[第1のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第2のPEgRNAが、構造:
5'-[第2のgRNAスペーサー配列]-[第2のgRNAコア]-[第2のDNA合成鋳型]-[第2のプライマー結合部位]-3'
を含む、
請求項105に記載のpegRNAのペア。
【請求項１０７】
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列に取り入れられる、請求項105または106に記載のpegRNAのペア。
【請求項１０８】
二重鎖の取り入れが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項107に記載のpegRNAのペア。
【請求項１０９】
挿入が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項108に記載のpegRNAのペア。

【請求項１１０】

欠失が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、

少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである、請求項108に記載のpegRNAのペア。

【請求項１１１】

置き換えが、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なく

とも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである、請求項108に記載のpegRNAのペア。

【請求項１１２】

請求項105～111のいずれか1項に記載のpegRNAのペアをコードするポリヌクレオチド。

【請求項１１３】

細胞においてpegRNAのペアを発現するための請求項112に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項１１４】

請求項113に記載のベクターを含む細胞。

【請求項１１５】

請求項105～111のいずれか1項に記載のpegRNAのペア、請求項113に記載のベクター、または請求項114に記載の細胞、および医薬賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項１１６】

ペアが:

a．i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の鎖上の第1の標的配列に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

b．i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の標的配列に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体、

を含む、

プライム編集因子複合体のペア。

【請求項１１７】

第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である、請求項116に記載のプライム編集因子複合体のペア。

【請求項１１８】

請求項116または117に記載のプライム編集因子複合体のペアをコードするポリヌク

レオチド。
【請求項１１９】
細胞においてプライム編集因子複合体を発現するための請求項118に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
【請求項１２０】
請求項119に記載のベクターを含む細胞。
【請求項１２１】
請求項116もしくは117に記載のプライム編集因子複合体のペア、請求項119に記載のベクター、または請求項120に記載の細胞、および医薬賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項１２２】
編集された部分を含む二重鎖の取り入れが標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項1～62のいずれか1項に記載のシステムまたは請求項73～104のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１２３】
挿入がペプチドタグである、請求項122に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２４】
ペプチドタグが、ポリヒスチジン(例えばHHHHHH)(配列番号252～262)、FLAG(例えばDYKDDDDK)(配列番号2)、V5(例えばGKPIPNPLLGLDST)(配列番号3)、GCN4、HA(例えばYPYDVPDYA)(配列番号5)、Myc(例えばEQKLISEED)(配列番号6)、またはGSTである、請求項123に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２５】
ペプチドタグが、配列番号1～6、245～249、252～262、264～273、275～276、281、278～288、および622からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項123に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２６】
挿入が免疫エピトープタグである、請求項122に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２７】
免疫エピトープタグが:テタヌストキソイド(配列番号396);ジフテリア毒素変異体CRM197(配列番号630);ムンプス免疫エピトープ1(配列番号400);ムンプス免疫エピトープ2(配列番号402);ムンプス免疫エピトープ3(配列番号404);風疹ウイルス(配列番号406);ヘマグルチニン(配列番号408);ノイラミニダーゼ(配列番号410);TAP1(配列番号412);TAP2(配列番号414);HLAクラスIに対するヘマグルチニンエピトープ(配列番号416);HLAクラスIに対するノイラミニダーゼエピトープ(配列番号418);HLAクラスIIに対するヘマグルチニンエピトープ(配列番号420);HLAクラスIIに対するノイラミニダーゼエピトープ(配列番号422);ヘマグルチニンエピトープH5N1結合HLAクラスIおよびクラスII(配列番号424);ならびにノイラミニダーゼエピトープH5N1結合HLAクラスIおよびクラスII(配列番号426)からなる群から選択される、請求項126に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２８】
挿入が二量体化ドメインである、請求項126に記載のシステムまたは方法。
【請求項１２９】
二量体化ドメインが、配列番号488のFKBP12、配列番号489のFKBP12-F36V、または配列番号490もしくは493～494のシクロフィリンの低分子結合ドメインである、請求項128に記載のシステムまたは方法。
【請求項１３０】
システムが:
a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;
b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体;
c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、
を含む第3のプライム編集因子複合体;
d)i．第4の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、
を含む第4のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、第3のPEgRNAが、第3の一本鎖DNA配列をコードする第3のDNA合成鋳型を含み、第4のPEgRNAが、第4の一本鎖DNA配列をコードする第4のDNA合成鋳型を含み;
第1および第3の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含み;
第2および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む、
編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステム。
【請求項１３１】
システムが:
a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、
を含む第1のプライム編集因子複合体;
b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体;
c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、
を含む第3のプライム編集因子複合体;
d)i．第4の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および
ii．編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、
を含む第4のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、第3のPEgRNAが、第3の一本鎖DNA配列をコードする第3のDNA合成鋳型を含み、第4のPEg

RNAが、第4の一本鎖DNA配列をコードする第4のDNA合成鋳型を含み;
第1および第3の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含み;
第2および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む、
1以上の二本鎖DNA配列を編集するためのシステム。
【請求項１３２】
第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および/または第4のプライム編集因子複合体のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である、請求項131に記載のシステム。
【請求項１３３】
(i)第1のPEgRNAが、さらに、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、および第1のプライマー結合部位を含み;
(ii)第2のPEgRNAが、さらに、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、および第2のプライマー結合部位を含み;
(iii)第3のPEgRNAが、さらに、第3のスペーサー配列、第3のgRNAコア、および第3のプライマー結合部位を含み;
(iv)第4のPEgRNAが、第4のスペーサー配列、第4のgRNAコア、第4のDNA合成鋳型、および第4のプライマー結合部位を含む、
請求項130～132のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１３４】
第1および第3の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する、請求項131に記載のシステム。
【請求項１３５】
第1のスペーサー配列が、編集されるべき第1の標的部位の上流の第1の二本鎖DNA配列の第1の結合部位に結合し、第2のスペーサー配列が、編集されるべき第1の標的部位の下流の第1の二本鎖DNA配列上の第2の結合部位に結合する、請求項134に記載のシステム。
【請求項１３６】
第3のスペーサー配列が、編集されるべき第2の標的部位の上流の第2の二本鎖DNA配列の第1の結合部位に結合し、第4のスペーサー配列が、編集されるべき第2の標的部位の下流の第2の二本鎖DNA配列上の第2の結合部位に結合する、請求項134または135に記載のシステム。
【請求項１３７】
第1および第2の結合部位が、第1の二本鎖DNAの第1の一続きの領域の2つの端を定める、請求項134～136のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１３８】
第3および第4の結合部位が、第2の二本鎖DNAの第2の一続きの領域の2つの端を定める、請求項134～137のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１３９】
第1および第2の結合部位または第3および第4の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核

酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項134に記載のシステム。

【請求項１４０】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する、請求項134～139のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４１】

二重鎖が第1の二本鎖DNAおよび/または第2の二本鎖DNAに組み込まれる、請求項140に記載のシステム。

【請求項１４２】

システムが、第1の二本鎖DNA上への第2の一続きの領域による第1の一続きの領域の置き換えをもたらす、請求項134～141のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４３】

システムが、第1の二本鎖DNAおよび第2の二本鎖DNAの間の第1の一続きの領域および第2の一続きの領域の交換をもたらす、請求項134～142のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４４】

第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および第4のプライム編集因子複合体が同じプライム編集因子を含む、請求項134～143のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４５】

RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1、第2、第3、および第4のポリペプチドが同じである、請求項134～144のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４６】

第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである、請求項134～145のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４７】

第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである、請求項134～146のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４８】

第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが: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る、請求項134～147のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１４９】

第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがニッカーゼ活性を有する、請求項134～148のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５０】

第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、配列番号2～65のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号2～65のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項134～149のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５１】

RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが、逆転写酵素である、請求項134～150のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５２】

RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが、配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項134～151のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５３】

(i)第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;

(ii)第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;

(iii)第3のプライム編集因子が、さらに、第3のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第3のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;および/または

(iv)第4のプライム編集因子が、さらに、第4のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第4のポリペプチドとを連結するリンカーを含む、

請求項134～152のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５４】

リンカーが、配列番号119～128のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号119～128のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項153に記載のシステム。

【請求項１５５】

リンカーが、長さが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アミノ酸である、請求項153または154に記載のシステム。

【請求項１５６】

第1、第2、第3、および/または第4のPEgRNAが、配列番号192～203のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号192～203のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む、請求項134～155のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１５７】

第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上

の第1の結合部位に結合する、請求項134～156のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１５８】
第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する、請求項134～157のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１５９】
第3のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する、請求項134～158のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１６０】
第4のプライム編集因子複合体の第4のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する、請求項134～159のいずれか1項に記載のシステム。
【請求項１６１】
PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、各第1および第2のプライム編集因子複合体の第1および/または第2のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項160に記載のシステム。
【請求項１６２】
PAM配列の存在下における第3および第4のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、各第3および第4のプライム編集因子複合体の第3および/または第4のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項161に記載のシステム。
【請求項１６３】
第1および第3の結合部位または第2および第4の結合部が、二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める、請求項133に記載のシステム。
【請求項１６４】
第1および第3の結合部位または第2および第4の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレ

オチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項163に記載のシステム。

【請求項１６５】

第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する、請求項130～164のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１６６】

一続きの領域が二重鎖によって置き換えられるようになる、請求項164に記載のシステム。

【請求項１６７】

二重鎖が標的部位の二本鎖DNAに組み込まれる、請求項166に記載のシステム。

【請求項１６８】

第1、第2、第3、および/または第4のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくと

も81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項122～167のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１６９】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、同じ長さを有する、請求項122～168のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１７０】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、異なる長さを有する、請求項122～169のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１７１】

第1、第2、第3、および/または第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、少なくとも15%、または少なくとも10%である、請求項122～170のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項１７２】

第1、第2、第3、および/または第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、

少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドであり、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列ならびに第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである、請求項122～171のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項173】

第1、第2、第3、および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である、請求項130～172のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項174】

編集された部分を含む二重鎖の組み込みが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項173に記載のシステム。

【請求項175】

請求項130～174のいずれか1項に記載の第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子をコードするポリヌクレオチド。

【請求項176】

請求項130～175のいずれか1項に記載の第1、第2、第3、および第4のPEgRNAをコードするポリヌクレオチド。

【請求項177】

請求項175または176に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項178】

請求項175もしくは176に記載のポリヌクレオチドまたは請求項177に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項179】

請求項175もしくは176に記載のポリヌクレオチド、請求項177に記載のベクター、または請求項178に記載の細胞、および医薬賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項180】

請求項175もしくは176に記載のポリヌクレオチドまたは請求項177に記載のベクター、および編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するための説明書を含む、キット。

【請求項181】

方法が、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、ペアが:

(a)i. 第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii. 標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の標的配列に結合する第

1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、
を含む第1のプライム編集因子複合体;
(b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の標的配列に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体;
(c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および
ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第3の標的配列に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、
を含む第3のプライム編集因子複合体;
(d)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および
ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第4の標的配列に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、
を含む第4のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のプライム編集因子複合体が、第1の標的配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第2のプライム編集因子複合体が、第2の標的配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第3のプライム編集因子複合体が、第3の標的配列における第3のニックと、第3のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第3の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第4のプライム編集因子複合体が、第4の標的配列における第4のニックと、第4のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第4の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換え;
第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換える、
標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法。
【請求項１８２】
第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および/または第4のプライム編集因子複合体のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である、請求項181に記載の方法。
【請求項１８３】
第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および第4のプライム編集因子複合体が同じプライム編集因子を含む、請求項181または182に記載の方法。
【請求項１８４】
第1、第2、第3、および/または第4のプライム編集因子複合体が異なるプライム編集

因子を含む、請求項181～183のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８５】
第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである、請求項181～184のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８６】
第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである、請求項181～185のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８７】
第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12cからなる群から選択される、請求項181～184のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８８】
第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがニッカーゼ活性を有する、請求項181～187のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１８９】
第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、配列番号2～65のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号2～65のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項181～188のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９０】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが逆転写酵素である、請求項181～189のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９１】
RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが、配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項181～190のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９２】
(i)第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;
(ii)第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;
(iii)第3のプライム編集因子が、さらに、第3のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第3のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;および/または
(iv)第4のプライム編集因子が、さらに、第4のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第4のポリペプチドとを連結するリンカーを含む、
請求項181～191のいずれか1項に記載の方法。
【請求項１９３】
リンカーが、配列番号119～128のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号119～128のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む、請求項192に記載の方法。
【請求項１９４】
リンカーが、長さが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アミノ酸である、請求項192または193に記載の方法。
【請求項１９５】
第1、第2、第3、および/または第4のPEgRNAが、配列番号192～203のいずれか1

つのヌクレオチド配列、または少なくとも80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号192～203のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む、請求項192～194のいずれか1項に記載の方法。

【請求項１９６】

第1のプライム編集因子複合体の第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する、請求項192～195のいずれか1項に記載の方法。

【請求項１９７】

第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する、請求項192～196のいずれか1項に記載の方法。

【請求項１９８】

第3のプライム編集因子複合体の第3のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する、請求項192～197のいずれか1項に記載の方法。

【請求項１９９】

第4のプライム編集因子複合体の第4のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する、請求項192～198のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２００】

PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体の第1および第2のスペーサー配列の結合が、各第1および第2のプライム編集因子複合体のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項199に記載の方法。

【請求項２０１】

PAM配列の存在下における第3および第4のプライム編集因子複合体の第3および第4のスペーサー配列の結合が、各第3および第4のプライム編集因子複合体のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす、請求項200に記載の方法。

【請求項２０２】

第1および第2の結合部位ならびに/または第3および第4の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める、請求項200または201に記載の方法。

【請求項２０３】

第1および第2の結合部位の間の一続きの領域ならびに/または第3および第4の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なく

とも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項202に記載の方法。

【請求項２０４】

一続きの領域が二重鎖によって置き換えられるようになる、請求項202または203に記載の方法。

【請求項２０５】

第1、第2、第3、および/または第4のＤＮＡ合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも7

5ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項181～204のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２０６】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する、請求項181～205のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２０７】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する、請求項181～206のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２０８】

相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、少なくとも15%、または少なくとも10%である、請求項181～207のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２０９】

相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、

少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである、請求項181～208のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２１０】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する、請求項188～209のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２１１】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である、請求項188～210のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２１２】

編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項204に記載の方法。

【請求項２１３】

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、標的DNA配列の端にあり、第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、同じ標的DNA配列の対向する端にある、請求項181～212のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２１４】

標的DNA配列が逆位させられる、請求項213に記載の方法。

【請求項２１５】

さらに、環状DNAドナーを提供することを含む、請求項181～214のいずれか1項に記載の方法。

【請求項２１６】

第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列が、標的DNA配列の対向する端にあり、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が環状DNAドナー上にある、請求項215に記載の方法。

【請求項２１７】

第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の間の環状DNAドナーのある部分が、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の間の標的配列を置き換える、請求項216に記載の方法。

【請求項２１８】

第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列が第1の核酸分子上にあり、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が第2の核酸分子上にある、請求項181～2

17のいずれか1項に記載の方法。
【請求項２１９】
第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の間の第1の核酸分子のある部分が、第2の核酸分子に組み込まれ、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の間の第2の核酸分子のある部分が、第1の核酸分子に組み込まれる、請求項218に記載の方法。
【請求項２２０】
第1の核酸分子が第1の染色体であり、第2の核酸分子が第2の染色体である、請求項218または219に記載の方法。
【請求項２２１】
PEgRNAが:
(a)編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)であって、第1のPEgRNAが第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、第1のDNA合成鋳型、および第1のプライマー結合部位を含み、第1のDNA合成鋳型が第1の一本鎖DNA配列をコードする;
(b)編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)であって、第2のPEgRNAが第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、第2のDNA合成鋳型、および第2のプライマー結合部位を含み、第2のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第2の一本鎖DNA配列をコードし、第2の一本鎖DNA配列が第1の一本鎖DNA配列に対して相補的である、
(c)編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)であって、第3のPEgRNAが第3のスペーサー配列、第3のgRNAコア、第3のDNA合成鋳型、および第3のプライマー結合部位を含み、第3のDNA合成鋳型が第3の一本鎖DNA配列をコードする;
(d)編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)であって、第4のPEgRNAが第4のスペーサー配列、第4のgRNAコア、第4のDNA合成鋳型、および第4のプライマー結合部位を含み、第4のDNA合成鋳型が第4の一本鎖DNA配列をコードし、第4の一本鎖DNA配列が、第3の一本鎖DNA配列に対する相補性の領域を含む、
を含む、
多重フラッププライム編集への使用のためのPEgRNAのセット。
【請求項２２２】
第1のPEgRNAが、構造:
5'-[第1のgRNAスペーサー配列]-[第1のgRNAコア]-[第1のDNA合成鋳型]-[第1のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第2のPEgRNAが、構造:
5'-[第2のgRNAスペーサー配列]-[第2のgRNAコア]-[第2のDNA合成鋳型]-[第2のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第3のPEgRNAが、構造:
5'-[第3のgRNAスペーサー配列]-[第3のgRNAコア]-[第3のDNA合成鋳型]-[第3のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第4のPEgRNAが、構造:
5'-[第4のgRNAスペーサー配列]-[第4のgRNAコア]-[第4のDNA合成鋳型]-[第4のプライマー結合部位]-3'
を含む、
請求項221に記載のPEgRNAのセット。
【請求項２２３】

第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第２の一本鎖ＤＮＡ配列ならびに/または第３の一本鎖ＤＮＡ配列および第４の一本鎖ＤＮＡ配列が二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位の二本鎖ＤＮＡ配列に取り入れられるようになる、請求項２２１または２２２に記載のＰＥｇＲＮＡのセット。

【請求項２２４】

二重鎖の取り入れが標的部位のＤＮＡの挿入、欠失、または置き換えをもたらす、請求項２２１～２２３のいずれか１項に記載のＰＥｇＲＮＡのセット。

【請求項２２５】

挿入が、長さが少なくとも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、少なくとも２６ヌクレオチド、少なくとも２７ヌクレオチド、少なくとも２８ヌクレオチド、少なくとも２９ヌクレオチド、少なくとも３０ヌクレオチド、少なくとも３１ヌクレオチド、少なくとも３２ヌクレオチド、少なくとも３３ヌクレオチド、少なくとも３４ヌクレオチド、少なくとも３５ヌクレオチド、少なくとも３６ヌクレオチド、少なくとも３７ヌクレオチド、少なくとも３８ヌクレオチド、少なくとも３９ヌクレオチド、少なくとも４０ヌクレオチド、少なくとも４１ヌクレオチド、少なくとも４２ヌクレオチド、少なくとも４３ヌクレオチド、少なくとも４４ヌクレオチド、少なくとも４５ヌクレオチド、少なくとも４６ヌクレオチド、少なくとも４７ヌクレオチド、少なくとも４８ヌクレオチド、少なくとも４９ヌクレオチド、少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも５１ヌクレオチド、少なくとも５２ヌクレオチド、少なくとも５３ヌクレオチド、少なくとも５４ヌクレオチド、少なくとも５５ヌクレオチド、少なくとも５６ヌクレオチド、少なくとも５７ヌクレオチド、少なくとも５８ヌクレオチド、少なくとも５９ヌクレオチド、少なくとも６０ヌクレオチド、少なくとも６１ヌクレオチド、少なくとも６２ヌクレオチド、少なくとも６３ヌクレオチド、少なくとも６４ヌクレオチド、少なくとも６５ヌクレオチド、少なくとも６６ヌクレオチド、少なくとも６７ヌクレオチド、少なくとも６８ヌクレオチド、少なくとも６９ヌクレオチド、少なくとも７０ヌクレオチド、少なくとも７１ヌクレオチド、少なくとも７２ヌクレオチド、少なくとも７３ヌクレオチド、少なくとも７４ヌクレオチド、少なくとも７５ヌクレオチド、少なくとも７６ヌクレオチド、少なくとも７７ヌクレオチド、少なくとも７８ヌクレオチド、少なくとも７９ヌクレオチド、少なくとも８０ヌクレオチド、少なくとも８１ヌクレオチド、少なくとも８２ヌクレオチド、少なくとも８３ヌクレオチド、少なくとも８４ヌクレオチド、少なくとも８５ヌクレオチド、少なくとも８６ヌクレオチド、少なくとも８７ヌクレオチド、少なくとも８８ヌクレオチド、少なくとも８９ヌクレオチド、少なくとも９０ヌクレオチド、少なくとも９１ヌクレオチド、少なくとも９２ヌクレオチド、少なくとも９３ヌクレオチド、少なくとも９４ヌクレオチド、少なくとも９５ヌクレオチド、少なくとも９６ヌクレオチド、少なくとも９７ヌクレオチド、少なくとも９８ヌクレオチド、少なくとも９９ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも１０１ヌクレオチド、少なくとも１０２ヌクレオチド、少なくとも１０３ヌクレオチド、少なくとも１０４ヌクレオチド、少なくとも１０５ヌクレオチド、少なくとも１０６ヌクレオチド、少なくとも１０７ヌクレオチド、少なくとも１０８ヌクレオチド、少なくとも１０９ヌクレオチド、または少なくとも１１０ヌクレオチドである、請求項２２４に記載のＰＥｇＲＮＡのセット。

【請求項２２６】

欠失が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである、請求項224に記載のPEgRNAのセット。

【請求項２２７】

置き換えが、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド

、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである、請求項224に記載のPEgRNAのセット。

【請求項２２８】

請求項221～227のいずれか1項に記載のPEgRNAのセットをコードするポリヌクレオチド。

【請求項２２９】

細胞において複数のPEgRNAを発現するための請求項228に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項２３０】

請求項229に記載のベクターを含む細胞。

【請求項２３１】

請求項221～227のいずれか1項に記載の複数のPEgRNA、請求項229に記載のベクター、または請求項230に記載の細胞、および医薬賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項２３２】

(i)ゲノムを二重フラッププライム編集システムと接触させ、前記のシステムが、標的部位の第1鎖上の第1のニック部位に第1の3'核酸フラップを組み入れることができる第1のプライム編集因子/pegRNA複合体、および標的部位の第2鎖上の第2のニック部位に第2の3'核酸フラップを組み入れることができる第2のプライム編集因子/pegRNA複合体を含み、

第1の3'核酸フラップおよび第2の3'核酸フラップが逆相補配列であり、これらが二重鎖を形成し、

二重鎖が第1のリコンビナーゼ部位を含み、

細胞が、第1および第2のニック部位の間に位置する内生二重鎖に代えて、標的部位に第1のリコンビナーゼ部位を含む二重鎖を組み入れること;

(ii)第2のリコンビナーゼ部位を含むドナー核酸と第1のリコンビナーゼ部位を接触さ

せること;ならびに
(iii)第1および第2のリコンビナーゼ部位の間の組み換えができるリコンビナーゼとゲノムを接触させ、それによってゲノム上の標的部位にドナー核酸を取り入れること、
を含む、細胞のゲノムを改変するための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
政府の支援
本発明は、国立衛生研究所によって授与された助成金第U01AI142756号、第RM1HG009490号、第R01EB022376号、および第R35GM118062号の下、政府の支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。
【０００２】
関連出願および参照による組み込み
本願は、2020年5月8日出願の米国仮出願第63/022,397号および2020年11月20日出願の米国仮出願第63/116,785号の優先権を主張する。これら夫々の内容全体はそれら全体が参照によって本願に組み込まれる。
【０００３】
この米国仮出願はまた、以下の出願、つまり、2019年3月19日出願の米国仮出願第62/820,813号(代理人整理番号B1195.70074US00)、2019年6月7日出願の米国仮出願第62/858,958号(代理人整理番号B1195.70074US01)、2019年8月21日出願の米国仮出願第62/889,996号(代理人整理番号B1195.70074US02)、2019年8月21日出願の米国仮出願第62/922,654号(代理人整理番号B1195.70083US00)、2019年10月10日出願の米国仮出願第62/913,553号(代理人整理番号B1195.70074US03)、2019年10月10日出願の米国仮出願第62/973,558号(代理人整理番号B1195.70083US01)、2019年11月5日出願の米国仮出願第62/931,195号(代理人整理番号B1195.70074US04)、2019年12月5日出願の米国仮出願第62/944,231号(代理人整理番号B1195.70074US05)、2019年12月5日出願の米国仮出願第62/974,537号(代理人整理番号B1195.70083US02)、2020年3月17日出願の米国仮出願第62/991,069号(代理人整理番号B1195.70074US06)、および2020年3月17日出願の米国仮出願(第63/100,548号)(代理人整理番号B1195.70083US03)も指し、参照により組み込む。加えて、この米国仮出願は、各々2020年5月19日に出願された国際PCT出願:第PCT/US20/23721号;第PCT/US20/23730号;第PCT/US20/23713号;第PCT/US20/23712号;第PCT/US20/23727号;第PCT/US20/23724号;第PCT/US20/23725号;第PCT/US20/23728号;第PCT/US20/23732号;第PCT/US20/23723号;第PCT/US20/23553号;および第PCT/US20/23583号を指し、参照により組み込む。
【背景技術】
【０００４】
本発明の背景
病原性のある単一ヌクレオチド突然変異は、ある推計によれば遺伝的要素が存在するヒト疾患のおよそ50％に寄与する[7]。残念ながら、これら遺伝性障害をもつ患者にとっての処置の選択肢は、数十年に及ぶ遺伝子治療探索に関わらず、依然として極度に限定的である[8]。おそらく、この治療上の課題への最も簡素な解決策は患者ゲノム中の単一ヌクレオチド突然変異の直接的な修正であって、これは疾患の根本的原因に対処し、かつ永続する恩恵を提供するかもしれない。かかるストラテジーはこれまでに考えられないことであったが、CRISRP/Cas系[9]の到来によってもたらされたゲノム編集性能における近年の改善は今や、この治療的アプローチを射程圏内に入れる。標的DNA配列に相補的な～20ヌクレオチドを含有するガイドRNA(gRNA)配列の簡単なデザインによって、想定されるほぼ全てのゲノム部位は、CRISPR関連(Cas)ヌクレアーゼによって特異的にアクセスされ得る[1,2]。今日まで、数種の単量体細菌性Casヌクレアーゼ系が同定されており、ゲノム編集用途に適応された[10]。このCasヌクレアーゼの天然の多様性は、増え続ける改変バ

リアントの一群と併せて[11～14]、新しいゲノム編集技術を開発するための肥沃な土壌を用意する。

【０００５】

CRISPRでの遺伝子破壊は今や成熟した技法であるとはいえ、ヒトゲノム中の単一塩基対の高精度編集は依然として大きな課題である[3]。相同組み換え修復(Homology directed repair)(HDR)は長い間、ヒト細胞および他の生物において、所望の編集をコードするドナーDNA修復鋳型を使用しDNA配列を二本鎖切断(double strand break)(DSB)の部位にて挿入、修正、または交換(exchange)するために使用されてきた[15]。しかしながら、既存のHDRは、ほとんどのヒト細胞型において、具体的に非分裂細胞において、極めて低い効率を有し、両立しない非相同末端結合(non-homologous end joining)(NHEJ)は、主として挿入-欠失(インデル(indel))副産物に繋がる[16]。他の問題点はDSBの生成に関するが、これは標的遺伝子座にて大きな染色体再配置および欠失を生じさせ得るか[17]、または成長停止(growth arrest)およびアポトーシスに繋がるp53軸を活性化する[18,19]。

【０００６】

数種のアプローチがHDRのこれら欠点に対処するために探索されてきた。例えば、単鎖DNA破壊(ニック)のオリゴヌクレオチドドナーでの修復は、インデル形成を低減することが示されたが、所望の修復産物の収率は依然として低い[20]。他のストラテジーは、小分子および生物学的試薬を使用して修復をNHEJよりHDRへ向かうよう偏らせることを試みている[21～23]。しかしながら、これらの方法の有効性は細胞型に依存し得、正常な細胞状態の撹乱は、望ましくなくかつ予測不可能な効果へ繋がり得る。

【０００７】

近年、Devid Liu教授らが率いる本発明者らは、DSBを創出することもHDRに頼ることもなく標的ヌクレオチドを編集する技術として塩基編集を開発した[4～6,24～27]。Cas融合デアミナーゼによるDNA塩基の直接修飾は、極めて高効率の短い標的窓(short target window)(～5～7塩基)におけるC・G→T・AまたはA・T→G・C塩基対変換を可能にさせる。結果として、塩基編集因子(base editors)は科学界によって迅速に採用された。しかしながら、以下の因子は、高精度ゲノム編集のためのそれらの一般性を限定する:(1)標的窓上の非標的CまたはA塩基の「バイスタンダー(bystander)編集」が観察され;(2)標的ヌクレオチド産物混合物が観察され;(3)標的塩基はPAM配列の15±2ヌクレオチド上流に位置付けられなければならず;(5)小さい挿入および欠失変異の修復は可能ではない。

【０００８】

したがって、所望されるいずれの単一ヌクレオチドの変化も柔軟に導入することが可能であるか、および/または塩基対の挿入または欠失(例として、少なくとも1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、もしくはそれより多くの塩基対の挿入または欠失)を組み入れ得るか、および/または標的部位にてヌクレオチド配列を高い特異性および効率で変更もしくは修飾し得る、プログラム型編集因子の開発は、CRISPRに基づくゲノム編集技術の範囲(scope)および治療可能性を実質的に拡大するであろう。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、「多重フラッププライム編集」と呼ばれるゲノム編集のための新たなプラットホームを記載し(例えば、「二重フラッププライム編集」および「四重フラッププライム編集」を包含する)、参照によって本願に組み込まれるAnzalone,A.V.et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 576,149-157(2019)において本発明者によって記載されている通り、「プライム編集」または「古典的プライム編集」の革新的な進歩を表す。古典的プライム編集は、種々の態様において、ニック部位において単一の3'フラップを重合し、これが同じ鎖上の標的核酸に取り入れられるようになるが、本記載の多重フラッププライム編集シ

ステムには別種の構築物、システム、および方法論が関わり、これらは、種々の態様において、異なる鎖上の3'フラップのペアまたは複数ペアを生成し、これらは所望の編集を含む二重鎖を形成し、かつこれらは例えばゲノム上の特異的な遺伝子座または編集部位における標的核酸分子に組み込まれるようになる。種々の側面において、3'フラップのペアまたは複数ペアは二重鎖を形成する。なぜなら、ひとたび本願に記載されるプライム編集因子によって生成されると、それらは互いにアニールする逆相補配列を含むからである。二重鎖は、隣接するニック部位間に位置付けられる内生二重鎖配列を天然に置き換える細胞によって駆動されるメカニズムによって標的部位に組み込まれるようになる。ある態様において、新たな二重鎖配列は、1以上の位置付けにおいて導入され得(例えば、隣接するゲノム遺伝子座にまたは2つの異なる染色体上の位置付けに)、目当ての1以上の配列、例えばタンパク質コード配列、ペプチドコード配列、またはRNAコード配列を含み得る。1つの態様では、多重フラッププライム編集システムによって組み入れられる新たな二重鎖配列は、リコンビナーゼ部位、例えば、Bxb1リコンビナーゼattB(38bp)および/もしくはattP(50bp)部位、またはHinリコンビナーゼ、Ginリコンビナーゼ、Tn3リコンビナーゼ、β-sixリコンビナーゼ、CinHリコンビナーゼ、ParAリコンビナーゼ、γδリコンビナーゼ、φC31リコンビナーゼ、TP901リコンビナーゼ、TG1リコンビナーゼ、φBT1リコンビナーゼ、R4リコンビナーゼ、φRV1リコンビナーゼ、φFC1リコンビナーゼ、MR11リコンビナーゼ、A118リコンビナーゼ、U153リコンビナーゼ、およびgp29リコンビナーゼ、Creリコンビナーゼ、FLPリコンビナーゼ、Rリコンビナーゼ、ラムダリコンビナーゼ、HK101リコンビナーゼ、HK022リコンビナーゼ、およびpSAM2リコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位を含み得る。

【００１０】

近年、本発明者らはプライム編集を開発した。これはエラーを起こしやすい二本鎖DNA切断を要求することなしにゲノムDNA配列の挿入、欠失、または置き換えを可能化する。プライム編集は、操作されたプライム編集ガイドRNA(pegRNA)とペアリングされた操作されたCas9ニッカーゼ-逆転写酵素融合タンパク質(PE1またはPE2)を用い、これはCas9を標的ゲノム部位に導くことおよび所望の編集を組み入れるための情報をコードすることの両方をする。プライム編集はマルチステップ編集プロセスによって進む:1)Cas9ドメインは、pegRNAのスペーサー配列によって規定される標的ゲノムDNA部位に結合およびニックを入れる;2)逆転写酵素ドメインはニックを入れられたゲノムDNAをプライマーとして用いて、逆転写のための鋳型としてpegRNA上の操作された伸長を用いる編集されたDNA鎖の合成を開始し、これは編集されたDNA配列を含有する一本鎖の3'フラップを生成する;3)細胞性のDNA修復が、5'フラップ種の押し除けによって3'フラップ中間体を解消し、これは、編集された3'フラップの侵入、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たな3'フラップのライゲーションによって生起し、1つの編集されたおよび1つの編集されない鎖のヘテロ二重鎖を形成する;4)細胞性のDNA修復が、修復のための鋳型として編集された鎖を用いて、ヘテロ二重鎖の編集されない鎖を置き換え、編集プロセスを完了する。

【００１１】

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部位に対して相同である配列の部分を含有するということを要求する。この相同性は、編集された3'フラップがDNA二重鎖への組み込みについて内生DNA鎖(対応する5'フラップ)と競合することを可能化する。編集された3'フラップは内生5'フラップよりも少ない配列相同性を含有するであろうから、競合は5'フラップ鎖を好むことが予想される。それゆえに、プライム編集の効率における可能性としての制限要因は、内生DNAの3'フラップの侵入ならびに5'フラップ鎖の続く押し除けおよび置き換えの効率であり得る。その上、首尾良い3'フラップ侵入および5'フラップの除去は、二本鎖DNAゲノムの1つの鎖のみに編集を組み込む。編集の永久的な組み入れは、鋳型として編集された鎖を用いて編集されない相補的なDNA鎖を置き換えるために、細胞性のDNA修復を要求する。細胞は、二次的なsgRNA(PE3システム)を用いて、編集に隣接する編集されない鎖上のニックの

導入によって、編集された鎖よりも編集されない鎖の置き換えを好むようにされ得るが(上のステップ4)、このプロセスは依然としてDNA修復の第2のステージに依拠する。長い5'および3'フラップ中間体の平衡化を要求または長い挿入もしくは長い欠失などの長い非相同的な領域を含有する編集については、これらのDNA修復ステップは特に非効率的であり得る。プライム編集のさらなる開発は当分野を進展させるであろう。

【００１２】

種々の側面において、本明細書は多重フラッププライム編集システム(例えば、二重プライム編集システムおよび四重プライム編集システムを包含する)を記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と編集されない相補的なゲノムDNA鎖への編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。二重フラッププライム編集システムにおいては、例えば、2つのpegRNAがゲノム部位の対向する鎖を標的化するために用いられ、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図91)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、二重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットするプライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。4つのpegRNAを用いる四重フラッププライム編集システムは類似の利点を提供する。

【００１３】

古典的プライム編集といった多重フラッププライム編集は、ポリメラーゼ(すなわち、融合タンパク質の形態であるか、または別様にnapDNAbpとはtransで提供される)と共働する核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を使用して、新しい遺伝情報を特定DNA部位中へ直接書き込む多目的かつ正確なゲノム編集方法であるが、プライム編集システムは、ガイドRNA上へ(例として、ガイドRNAの5'末もしくは3'末にて、または内部にて)改変される伸長(extension)(DNAまたはRNAのいずれか)を経由する置き換えDNA鎖の形態での所望の編集の合成のための標的部位と鋳型との両方を特定するプライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)でプログラムされる。所望の編集(例として、単一核酸塩基の置換)を含有する置き換え鎖は、編集されるべき標的部位(それが所望の編集を包含するのは例外として)の内生鎖と同じ配列を共有する。DNA修復および/または複製機構を通して、標的部位の内生鎖は、所望の編集を含有する新しく合成された置き換え鎖によって置き換えられる。いくつかのケースにおいて、本明細書に記載のとおりのプライム編集因子は、編集されるべき所望の標的部位を探査し位置付けるのみならず、同時に、内生DNA鎖の対応する標的部位の代わりに組み入れられる所望の編集を含有する置き換え鎖をコードするところ、プライム編集は「探査-と-置き換え(search-and-replace)」ゲノム編集技術であると考えられることもある。

【００１４】

本開示の多重フラッププライム編集因子は、標的にプライムされた(target-primed)逆転写(TPRT)または「プライム編集」の機序が、効率および遺伝子の融通性(genetic flexibility)が高い高精度CRISPR/Casベースのゲノム編集を(例として、図1A～1Fの様々な態様において描かれているとおり)行うために活用または採用され得るという発見に、一部関する。TPRTは天然には、哺乳動物の非LTRレトロトランスポゾンおよび細菌のグループIIイントロンなどの可動DNA因子(mobile DNA elements)によって使用される[28,29]。本発明者らは本明細書中、特定のDNA配列をガイドRNAで標的にし、標的

部位にて単鎖ニックを生成し、およびニック入りDNAを、ガイドRNAで取り入れられた改変逆転写酵素鋳型の逆転写のためのプライマーとして使用する、Casタンパク質-逆転写酵素の融合体または関連する系を使用している。しかしながら、この概念は逆転写酵素をDNAポリメラーゼの構成要素として使用する多重フラッププライム編集因子から始まったものの、本明細書に記載のプライム編集因子は逆転写酵素に限定されず、事実上はDNAポリメラーゼの使用を包含していてもよい。実際に本願は全体を通し「逆転写酵素」をもつ多重フラッププライム編集因子に言及することもあるが、逆転写酵素は、多重フラッププライム編集で働き得る唯一のタイプのDNAポリメラーゼであることが本明細書に説明されている。よって、本明細書のどこで「逆転写酵素」に言及しようとも、当業者は、いずれの好適なDNAポリメラーゼも逆転写酵素の代わりに使用されてもよいことを解するはずである。よって、一側面において、多重フラッププライム編集因子は、標的DNA中の相補的なプロトスペーサーとアニールするスペーサー配列を含有する特化されたガイドRNA(すなわち、PEgRNA)とDNA配列を結び付けることによってDNA配列を標的にするようプログラムされているCas9(または等価なnapDNAbp)を含んでいてもよい。特化されたガイドRNAはまた、対応する内生DNA鎖を標的部位にて置き換えるために使用される所望の遺伝子変更を含有するDNAの置き換え鎖をコードする伸長という形態で、新しい遺伝情報も含有する。情報をPEgRNAから標的DNAへ伝達するため、多重フラッププライム編集の機序は、3'ヒドロキシル基を晒すDNAの一方の鎖中の標的部位にニックを入れることを伴う。晒される3'ヒドロキシル基は次いで、PEgRNA上の、編集をコードする伸長の、標的部位中への直接的なDNA重合をプライムするのに使用され得る。様々な態様において、伸長－これは編集を含有する置き換え鎖の重合のための鋳型を提供する－は、RNAまたはDNAから形成され得る。RNA伸長のケースにおいて、プライム編集因子のポリメラーゼは、RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素など)であり得る。DNA伸長のケースにおいて、プライム編集因子のポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼであってもよい。

【００１５】

古典的プライム編集において、本明細書に開示のプライム編集因子によって形成された、新しく合成された鎖(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、またはそれらの組み合わせ)を包含することを除けば、ゲノムの標的配列と相同である(すなわち、これと同じ配列を有する)であろう。新しく合成された(または置き換え)DNAの鎖はまた、単鎖DNAフラップと称されることもあるが、これはハイブリダイゼーションを相補的な相同の内生DNA鎖と競合し、これによって対応する内生鎖に取って代わる。ある態様において、系は、エラーを起こしやすい(error-prone)逆転写酵素(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ドメインとはtransで提供される)の使用と組み合わせられ得る。エラーを起こしやすい逆転写酵素は、単鎖DNAフラップ合成の最中に変更を導入し得る。よって、ある態様において、エラーを起こしやすい逆転写酵素は、ヌクレオチド変化を標的DNAへ導入するために利用され得る。系とともに使用される、エラーを起こしやすい逆転写酵素に応じて、変化はランダムまたは非ランダムであり得る。

【００１６】

古典的プライム編集において、ハイブリダイズされた中間体(内生DNA鎖とハイブリダイズされた逆転写酵素によって合成された単鎖DNAフラップを含む)の分解は、その結果得られる内生DNAの、取って代わられたフラップの(例として、5'末DNAフラップエンドヌクレアーゼ、FEN1での)除去、合成された単鎖DNAフラップの標的DNAへのライゲーション、ならびに細胞の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。鋳型化(templated)DNA合成が、単一ヌクレオチドという高精度を、挿入および欠失を包含する、いずれのヌクレオチドの修飾にも付与することから、このアプローチの幅は極めて広く、基礎科学および治療法における無数の用途に使用され得ることが予見できる。

【００１７】
いくつかの側面において、本明細書は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とDNAポリメラーゼとをそれぞれが含むプライム編集因子のペアを提供する。いくつかの態様において、各プライム編集因子は、伸長されたガイドRNAの存在下において標的によってプライミングされる逆転写によるゲノム編集を実行することができる。
【００１８】
いくつかの側面において、本明細書は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とDNAポリメラーゼとをそれぞれが含むプライム編集因子のペアを提供し、DNAポリメラーゼはnapDNAbpとはトランスで提供される。種々の態様において、各プライム編集因子は、伸長されたガイドRNAの存在下において標的によってプライミングされる逆転写によるゲノム編集を実行することができる。
【００１９】
いくつかの側面において、本明細書は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)と逆転写酵素とをそれぞれが含むプライム編集因子のペアを提供する。種々の態様において、各プライム編集因子は、伸長されたガイドRNAの存在下において標的によってプライミングされる逆転写によるゲノム編集を実行することができる。
【００２０】
いくつかの側面において、本明細書は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)と逆転写酵素とをそれぞれが含むプライム編集因子のペアを提供し、逆転写酵素はnapDNAbpとはトランスで提供される。種々の態様において、各プライム編集因子は、伸長されたガイドRNAの存在下において標的によってプライミングされる逆転写によるゲノム編集を実行することができる。
【００２１】
ある態様において、napDNAbpはニッカーゼ活性を有する。napDNAbpは、Cas9タンパク質またはその機能的等価物、例えばヌクレアーゼ活性Cas9、ヌクレアーゼ不活性型Cas9(dCas9)、またはCas9ニッカーゼ(nCas9)でもまたあり得る。
【００２２】
ある態様において、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、任意にニッカーゼ活性を有する。
【００２３】
他の態様において、二重プライム編集因子の各プライム編集因子は、伸長されたガイドRNAと複合体化したときに標的DNA配列に結合することができる。
【００２４】
なお他の態様において、標的DNA配列は標的鎖および相補的な非標的鎖を含む。
【００２５】
他の態様において、伸長されたガイドRNAに対する複合体化したプライム編集因子の結合はRループを形成する。Rループは(i)伸長されたガイドRNAと標的鎖とを含むRNA-DNAハイブリッドおよび(ii)相補的な非標的鎖を含み得る。
【００２６】
なお他の態様において、相補的な非標的鎖はニッキングされて、遊離の3'端を有する逆転写酵素プライム配列を形成する。
【００２７】
種々の態様において、伸長されたガイドRNAは、(a)ガイドRNAと、(b)ガイドRNAの5'もしくは3'端またはガイドRNAの分子内の位置付けにおけるRNA伸長とを含む。RNA伸長は、(i)所望のヌクレオチド変化を含む逆転写鋳型配列と、(ii)逆転写プライマー結合部位と、(iii)任意にリンカー配列とを含み得る。種々の態様において、逆転写鋳型配列は、ニック部位に隣接する内生DNA配列に対して相補的である一本鎖DNAフラップをコードし得、一本鎖DNAフラップは所望のヌクレオチド変化を含む。
【００２８】

様々な態様において、RNA伸長は、長さが少なくとも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、または少なくとも25ヌクレオチドである。

【００２９】

なお他の態様において、一本鎖DNAフラップは、ニック部位に隣接する内生DNA配列にハイブリダイズし、それによって所望のヌクレオチド変化を組み入れ得る。なお他の態様において、一本鎖DNAフラップは、遊離の5'端を有しかつニック部位に隣接する内生DNA配列に取って代わる。ある態様において、5'端を有する取って代わられた内生DNAは細胞によって切除される。

【００３０】

種々の態様において、一本鎖DNAフラップの細胞性修復は所望のヌクレオチド変化の組み入れをもたらし、それによって所望の産物を形成する。

【００３１】

種々の他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、PAM配列の約-4～+10の間にある編集窓上に組み入れされる。

【００３２】

なお他の態様において、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組み入れされる。

【００３３】

種々の態様において、二重プライム編集因子のnapDNAbpは各々、配列番号18のアミノ酸配列を含む。種々の他の態様において、napDNAbpは、配列番号26～39、42～61、75～76、126、130、137、141、147、153、157、445、460、467、および482～487(Cas9);配列番号77～86(CP-Cas9);配列番号18～25および87～88(SpCas9);および配列番号62～72(Cas12)のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む。

【００３４】

他の態様において、開示されるプライム編集因子および/または二重プライム編集因子の組成物は、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、235、454、471、516、662、700～716、739～742、および766のアミノ酸配列のいずれか1つを含み得る。なお他の態様において、逆転写酵素は、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、235、454、471、516、662、700～716、739～742、および766のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。これらの配列は例えばレトロウイルスもしくはレトロトランスポゾンからの天然に存在する逆転写酵素配列であり得るか、または配列は組み換えであり得る。

【００３５】

種々の他の態様において、本明細書に開示される二重プライム編集因子のプライム編集因子は種々の構造的構成を含み得る。例えば、プライム編集因子が融合タンパク質として提供される態様において、二重プライム編集因子融合タンパク質の各々は、構造NH2-[n

apDNAbp]-[逆転写酵素]-COOH;またはNH2-[逆転写酵素]-[napDNAbp]-COOHを含み得、「]-[」の夫々のものは任意のリンカー配列の存在を指示する。

【００３６】

種々の態様において、リンカー配列は、配列番号127、165～176、446、453、および767～769のアミノ酸配列、または配列番号127、165～176、446、453、および767～769のリンカーアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも80％、85％、もしくは90％、もしくは95％、もしくは99％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００３７】

種々の態様において、標的DNA上に組み込まれる所望のヌクレオチド変化は、1ヌクレオチド変化(例えば、トランジションまたはトランスバージョン)、1以上のヌクレオチドの挿入、または1以上のヌクレオチドの欠失であり得る。

【００３８】

ある種のケースでは、挿入は、長さが少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【００３９】

ある種の他のケースでは、欠失は、長さが少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【００４０】

別の側面において、本開示はガイドRNAと少なくとも1つのRNA伸長とを含む伸長されたガイドRNAを提供する。RNA伸長はガイドRNAの3'端に位置取り得る。他の態様において、RNA伸長はガイドRNAの5'に位置取り得る。なお他の態様において、RNA伸長はガイドRNA上の分子内位置に位置取り得る。しかしながら、好ましくは、伸長された部分の分子内の位置取りはプロトスペーサーの機能を遮断しない。

【００４１】

様々な態様において、プライム編集因子ガイドRNA(PEgRNA)は、napDNAbpへ結合すること、およびnapDNAbpを標的DNA配列へ向かわせることが可能である。標的DNA配列は、標的鎖および相補的な非標的鎖を含み得るが、ここでガイドRNAは、標的鎖とハイブリダイズすることでRNA-DNAハイブリッドおよびRループを形成する。

【００４２】

プライム編集因子ガイドRNAの様々な態様において、少なくとも1のRNA伸長は、DNA合成鋳型を含む。様々な他の態様において、RNA伸長は、逆転写プライマー結合部位をさらに含む。更なる他の態様において、RNA伸長は、RNA伸長をガイドRNAへ結び合わせるリンカーまたはスペーサーを含む。

【００４３】

様々な態様において、RNA伸長は、長さが少なくとも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、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも150ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドであり得る。

【００４４】

他の態様において、DNA合成鋳型(すなわち、図27につき、編集鋳型)は、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【００４５】

更なる他の態様において、逆転写プライマー結合部位配列(すなわち、図27につき、プライマー結合部位)は、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【００４６】

他の態様において、任意のリンカーまたはスペーサーは、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【００４７】

伸長されたガイドRNAの種々の態様では、逆転写鋳型配列は、ニック部位に隣接する内生DNA配列に対して相補的である一本鎖DNAフラップをコードし得、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フラップは内生一本鎖DNAをニック

部位において取って代わられ得る。ニック部位における取って代わられた内生一本鎖DNAは5'端を有し得、内生フラップを形成し得、これは細胞によって切除され得る。種々の態様において、5'端の内生フラップの切除は産物形成を駆動し得る。なぜなら、5'端の内生フラップを除去することは、対応する相補的なDNA鎖に対する一本鎖3'DNAフラップのハイブリダイゼーションと、標的DNAへの一本鎖3'DNAフラップによって持たれる所望のヌクレオチド変化の組み込みまたは同化とを促すからである。

【００４８】

伸長されたガイドRNAの種々の態様では、一本鎖DNAフラップの細胞性修復は所望のヌクレオチド変化の組み入れをもたらし、それによって所望の産物を形成する。

【００４９】

[0043][0042]ある態様において、PEgRNAは、配列番号101～104、181～183、223～234、237～244、277、324～330、332、334、336、338、340、342、344、346、348、350、352、354、356、358、360、362、364、366、368、394、429～442、499～505、641～649、678～692、735～736、757～761、776～777、2997～3103、3113～3121、3305～3455、3479～3493、3522～3540、3549～3556、3628～3698、3755～3810、3874、3890～3901、3905～3911、3913～3929、および3972～3989のヌクレオチド配列、または少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を配列番号101～104、181～183、223～234、237～244、277、324～330、332、334、336、338、340、342、344、346、348、350、352、354、356、358、360、362、364、366、368、394、429～442、499～505、641～649、678～692、735～736、757～761、776～777、2997～3103、3113～3121、3305～3455、3479～3493、3522～3540、3549～3556、3628～3698、3755～3810、3874、3890～3901、3905～3911、3913～3929、および3972～3989のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

【００５０】

本発明のもう1つの側面において、本明細書は、本明細書に記載のプライム編集因子および上に記載のいずれかの伸長されたガイドRNAを含む複合体を提供する。

【００５１】

本発明の更なる他の側面において、本明細書は、napDNAbpおよび伸長されたガイドRNAを含む複合体を提供する。napDNAbpは、Cas9ニッカーゼであり得るか、あるいは配列番号42～57(Cas9ニッカーゼ)および65(AsCas12aニッカーゼ)のアミノ酸配列、または配列番号42～57(Cas9ニッカーゼ)および65(AsCas12aニッカーゼ)のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列であり得る。

【００５２】

複合体を伴う様々な態様において、伸長されたガイドRNAは、napDNAbpを標的DNA配列へ向かわせることが可能である。様々な態様において、逆転写酵素はtransで提供されてもよい、すなわち、複合体自体とは異なる供給源から提供されてもよい。例えば、逆転写酵素は、逆転写酵素を個別にコードする別々のベクターを導入することによって、複合体を有する同じ細胞へ提供され得る。

【００５３】

別の側面において、本開示は、第1および第2のプライム編集因子複合体を含むシステムを提供し、各複合体はプライム編集因子およびプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含み、各PEgRNAはスペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。ある態様において、各DNA合成鋳型は、編集された部分を含む一本鎖DNA配列をコードする。コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対して相補的であり得、

編集されるべき標的部位に取り入れられる二重鎖を形成し得る。いくつかの態様において、コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対する相補性の領域を含み得る。ある態様において、コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対する相補性の領域を含み得、これが少なくとも2bp、少なくとも3bp、少なくとも4bp、少なくとも5bp、少なくとも10bp、少なくとも20bp、少なくとも30bp、少なくとも40bp、少なくとも50bp、少なくとも100bp、少なくとも200bp、少なくとも300bp、少なくとも400bp、少なくとも500bp、少なくとも600bp、少なくとも700bp、少なくとも800bp、少なくとも900bp、または少なくとも1000bpの長さである。いくつかの態様において、プライム編集因子は融合タンパク質として提供される。ある態様において、プライム編集因子の構成要素(すなわち、napDNAbpおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチド)はトランスで提供される。

【００５４】

別の側面において、本開示は第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子複合体を含むシステムを提供し、各複合体はプライム編集因子およびプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含み、各PEgRNAはスペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。ある態様において、各DNA合成鋳型は、編集された部分を含む一本鎖DNA配列をコードする。コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対して相補的であり得、編集されるべき標的部位に取り入れられる二重鎖を形成し得る。いくつかの態様において、コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対する相補性の領域を含み得る。ある態様において、コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対する相補性の領域を含み得、これが少なくとも2bp、少なくとも3bp、少なくとも4bp、少なくとも5bp、少なくとも10bp、少なくとも20bp、少なくとも30bp、少なくとも40bp、少なくとも50bp、少なくとも100bp、少なくとも200bp、少なくとも300bp、少なくとも400bp、少なくとも500bp、少なくとも600bp、少なくとも700bp、少なくとも800bp、少なくとも900bp、または少なくとも1000bpの長さである。いくつかの態様において、プライム編集因子は融合タンパク質として提供される。ある態様において、プライム編集因子の構成要素(すなわち、napDNAbpおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチド)はトランスで提供される。

【００５５】

いくつかの態様において、各napDNAbpはCas9ドメインまたはそのバリアントである。いくつかの態様において、各napDNAbpはヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。ある態様において、各napDNAbpは、独立して: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、任意に、ニッカーゼ活性を有する。種々の態様において、各napDNAbpは、配列番号2～65のいずれか1つのアミノ酸配列、または配列番号2～65のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含む。

【００５６】

いくつかの態様において、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むポリペプチドは逆転写酵素である。ある態様において、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むポリペプチドは、配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

【００５７】

いくつかの態様において、各プライム編集因子は、napDNAbpおよび逆転写酵素を連結するリンカーを含み得る。ある態様において、リンカーは、配列番号119～128のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99

％の配列同一性を配列番号119～128のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。各リンカーは、長さが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アミノ酸であり得る。

【００５８】

いくつかの態様において、各PEgRNAは、独立して、配列番号192～203のいずれか1つのヌクレオチド配列、または80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号192～203のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含み得る。

【００５９】

種々の態様において、各PEgRNAの各スペーサー配列は、編集されるべき標的部位に隣接する二本鎖DNA配列上の特異的な結合部位に結合し得る。いくつかの態様において、二本鎖DNA配列の1つの鎖に対する1つのプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合と、二本鎖DNA配列の対向する鎖に対する別のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合とは、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、両方のDNA鎖のニック入れをもたらす。

【００６０】

別の側面において、本開示はポリヌクレオチドを提供する。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは本願に記載される複合体のいずれかをコードし得る。ある態様において、ポリヌクレオチドは本願に記載されるPEgRNAのいずれかをコードし得る。

【００６１】

さらに別の側面において、本明細書はポリヌクレオチドを提供する。ある態様において、ポリヌクレオチドは本明細書に開示のプライム編集因子のいずれかをコードし得る。ある種の他の態様において、ポリヌクレオチドは本明細書に開示のnapDNAbpのいずれかをコードし得る。なおさらなる態様では、ポリヌクレオチドは本明細書に開示の逆転写酵素のいずれかをコードし得る。さらに他の態様において、ポリヌクレオチドは、本明細書に開示の伸長されたガイドRNAのいずれか、逆転写鋳型配列のいずれか、または逆転写プライマー部位のいずれか、または任意のリンカー配列のいずれかをコードし得る。

【００６２】

依然として他の側面において、本明細書は、本願に記載されるポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。それゆえに、ある態様において、ベクターは、(すなわち、融合タンパク質として、またはトランスで発現される)napDNAbpと逆転写酵素とを含むプライム編集因子をコードするためのポリヌクレオチドを含む。ある態様において、ベクターは、本願に記載される複合体のいずれかをコードするためのポリヌクレオチドを含む。他の態様において、ベクターは、napDNAbpおよび逆転写酵素を別個にコードするポリヌクレオチドを含む。依然として他の態様において、ベクターは、伸長されたガイドRNAをコードするポリヌクレオチドを含み得る。種々の態様において、ベクターは、napDNAbp、逆転写酵素、および伸長されたガイドRNAを同じまたは別個のベクター上にコードする1以上のポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様において、ベクターは、本願に記載されるpegRNAのいずれかをコードするためのポリヌクレオチドを含む。

【００６３】

依然として他の側面において、本明細書は、本願に記載されるプライム編集因子と伸長されたガイドRNAとを含む細胞を提供する。細胞は、プライム編集因子、napDNAbp、逆転写酵素、および伸長されたガイドRNAを含むベクターによって形質転換され得る。これらの遺伝子エレメントは同じベクター上にまたは異なるベクター上に含まれ得る。いくつかの態様において、細胞は、本願に記載されるシステムまたは複合体のいずれかを含む。細胞は、本願において開示されるシステム、複合体、および/もしくはpegRNAのいずれかをコードするポリヌクレオチド、または本願において開示されるシステム、複合体、もしくはpegRNAのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むベクターによって形質転換され得る。

【００６４】
なおも別の側面において、本明細書は医薬組成物を提供する。ある態様において、医薬組成物は、napDNAbp、プライム編集因子、逆転写酵素、および伸長されたガイドRNAの1以上を含む。ある態様において、医薬組成物は本願に記載されるシステムおよび/または複合体のいずれかを含む。ある態様において、医薬組成物は、本願に記載されるプライム編集因子、システム、または複合体のいずれかと薬学的に許容される賦形剤とを含む。他の態様において、医薬組成物は、本願に記載されるいずれかの伸長ガイドRNAと薬学的に許容される賦形剤とを含む。依然として他の態様において、医薬組成物は、本願に記載されるいずれかの伸長ガイドRNAを、本願に記載されるいずれかのプライム編集因子および薬学的に許容される賦形剤との組み合わせで含む。なおも他の態様において、医薬組成物は、napDNAbp、プライム編集因子、逆転写酵素、および伸長されたガイドRNAの1以上をコードするいずれかのポリヌクレオチド配列、または本願において開示されるベクターのいずれかを含む。依然として他の態様において、本願において開示される種々の構成要素は、1以上の医薬組成物へと分離され得る。例えば、第1の医薬組成物はプライム編集因子またはnapDNAbpを含み得、第2の医薬組成物は逆転写酵素を含み得、第3の医薬組成物は伸長されたガイドRNAを含み得る。

【００６５】
またさらなる側面において、本開示は、キットを提供する。一態様において、キットは、プライム編集因子、napDNAbp、逆転写酵素、および伸長されたガイドRNAを包含する1以上の構成要素をコードする1以上のポリヌクレオチドを含む。キットはまた、本明細書に開示のいずれのプライム編集因子、napDNAbp、または逆転写酵素を包含する、ベクター、細胞、およびポリペプチドの単離された調製物も含んでいてよい。

【００６６】
なおも別の側面において、本開示は、開示される組成物を用いる方法を提供し、標的部位における二本鎖DNA配列の両方の相補鎖を同時編集するために、本願に記載されるシステムのいずれかを用いる方法を包含する。いくつかの態様において、方法は、本願において開示されるシステムのいずれかと二本鎖DNA配列を接触させることを含む。

【００６７】
一側面において、本開示は、第1および第2のプライム編集因子複合体と標的部位における二本鎖DNA配列を接触させることを含む方法を提供し、各複合体はプライム編集因子およびプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含み、各PEgRNAは、スペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は融合タンパク質として提供される。いくつかの態様において、プライム編集因子の構成要素はトランスで提供される。ある態様において、各DNA合成鋳型は、編集された部分を含む一本鎖DNA配列をコードする。コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対して相補的であり得、編集されるべき標的部位に取り入れられる二重鎖を形成し得る。プライム編集因子複合体の種々の要素は、本願において開示されるシステムの態様のいずれかを含み得る。

【００６８】
別の側面において、本開示は、第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子複合体と標的部位における二本鎖DNA配列を接触させることを含む方法を提供し、各複合体はプライム編集因子およびプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含み、各PEgRNAはスペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は融合タンパク質として提供される。いくつかの態様において、プライム編集因子の構成要素はトランスで提供される。ある態様において、各DNA合成鋳型は一本鎖DNA配列をコードする。コードされる2つの一本鎖DNA配列は互い

に対して相補的であり得、編集されるべき標的部位に取り入れられる二重鎖を形成し得る。プライム編集因子複合体の種々の要素は、本願において開示されるシステムの態様のいずれかを含み得る。

【００６９】

いくつかの態様において、本願において提供される方法は、標的ＤＮＡ配列の逆位を許す。いくつかの態様において、第１のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第２のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列は、標的ＤＮＡ配列の対向する端にあり、第３のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列は、同じ標的ＤＮＡ配列の対向する端にある。

【００７０】

いくつかの態様において、本願において提供される方法は、さらに、環状ＤＮＡドナーを提供することを含む。ある態様において、第１のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列は、標的ＤＮＡ配列の対向する端にあり、第２のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列は、環状ＤＮＡドナー上にある。いくつかの態様において、第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４の一本鎖ＤＮＡ配列の間の環状ＤＮＡドナーの部分は、第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３の一本鎖ＤＮＡ配列の間の標的ＤＮＡ配列を置き換える。

【００７１】

いくつかの態様において、本願において提供される方法は、第１の核酸分子(例えば、第１の染色体)から第２の核酸分子(例えば、第２の染色体)への標的ＤＮＡ配列の転座を許す。いくつかの態様において、第１のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３の一本鎖ＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列は、第１の核酸分子上にあり、第２のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列は、第２の核酸分子上にある。ある態様において、第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３の一本鎖ＤＮＡ配列の間の第１の核酸分子の部分は、第２の核酸分子に組み込まれる。ある態様において、第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４の一本鎖ＤＮＡ配列の間の第２の核酸分子の部分は、第１の核酸分子に組み込まれる。

【００７２】

別の側面において、本開示は、多重フラッププライム編集への使用のためのＰＥｇＲＮＡのペアを提供する。いくつかの態様において、ペアは第１のＰＥｇＲＮＡおよび第２のＰＥｇＲＮＡを含み、各ＰＥｇＲＮＡは、独立して、スペーサー配列、ｇＲＮＡコア、ＤＮＡ合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。ある態様において、各ＤＮＡ合成鋳型は一本鎖ＤＮＡ配列をコードする。種々の態様において、多重フラッププライム編集因子は、別個のプライム編集因子を標的部位の両側へと標的化するＰＥｇＲＮＡのペアと関連して用いられ、ＰＥｇＲＮＡのペアは、互いの逆相補物である核酸配列を含む3'核酸フラップをそれぞれがコードする。種々の態様において、逆相補配列を含む3'フラップは互いにアニールして、ＰＥｇＲＮＡによってコードされる所望の編集または核酸配列を含む二重鎖を形成し得る。それから、二重鎖は、隣接するニック部位間に位置する対応する内生二重鎖の置き換えによって標的部位に取り入れられるようになる。

【００７３】

別の側面において、本開示は、多重フラッププライム編集への使用のための複数のＰＥｇＲＮＡを提供する。いくつかの態様において、複数は、第１、第２、第３、および第４のＰＥｇＲＮＡを含む。いくつかの態様において、４つのＰＥｇＲＮＡのそれぞれは、独立して、スペーサー配列、ｇＲＮＡコア、ＤＮＡ合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。ある態様において、各ＤＮＡ合成鋳型は一本鎖ＤＮＡ配列をコードする。コードされる２つの一本鎖ＤＮＡ配列は互いに対して相補的であり得る。

【００７４】

種々の側面において、本開示は、本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。ある側面において、本開示は、本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれかをコードするポリヌクレオチドをコードするベクターを提供する。なおも別の側面において、本開示は、本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれかをコードするポリヌクレオチドをコードするベクターを含む細胞を提供する。他の側面において、本開示は、本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれか、本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれかをコードするベクター、または本願に記載されるPEgRNAのペアまたは複数のいずれかをコードするベクターを含む細胞を含む医薬組成物を提供する。ある態様において、医薬組成物は医薬賦形剤を含む。

【００７５】

1つの態様では、方法は、所望のヌクレオチド変化を二本鎖DNA配列上に組み入れるための方法に関する。方法は、第1に、二本鎖DNA配列をプライム編集因子と伸長されたガイドRNAとを含む複合体と接触させることを含み、プライム編集因子はnapDNAbpおよび逆転写酵素を含み、伸長されたガイドRNAは、所望のヌクレオチド変化を含む逆転写鋳型配列を含む。いくつかの態様において、各プライム編集因子は融合タンパク質として提供される。いくつかの態様において、プライム編集因子の構成要素はトランスで提供される。次に、方法には、非標的鎖上で二本鎖DNA配列へニックを入れることが関わり、それによって3'端を有する遊離の一本鎖DNAを生成する。それから、方法には、遊離の一本鎖DNAの3'端を逆転写鋳型配列にハイブリダイズさせることが関わり、それによって逆転写酵素ドメインをプライムする。それから、方法には、DNAの鎖を3'端から重合することが関わり、それによって所望のヌクレオチド変化を含む一本鎖DNAフラップを生成する。それから、方法には、カットされた部位に隣接する内生DNA鎖を一本鎖DNAフラップによって置き換えることが関わり、それによって所望のヌクレオチド変化を二本鎖DNA配列上に組み入れる。

【００７６】

他の態様において、本開示は、標的遺伝子座にてDNA分子のヌクレオチド配列中に1以上の変化を導入するための方法を提供するが、DNA分子を、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とnapDNAbpに標的遺伝子座を標的にさせるガイドRNAとに接触させることを含み、ここでガイドRNAは、少なくとも1の所望のヌクレオチド変化を含む逆転写酵素(RT)鋳型配列を含む。次に、方法は、標的遺伝子座にてDNA鎖中に、晒された3'末を形成すること、次いで、晒された3'末をRT鋳型配列とハイブリダイズさせることで逆転写をプライムすることを伴う。次に、RT鋳型配列に基づき少なくとも1の所望のヌクレオチド変化を含む単鎖DNAフラップは、逆転写酵素によって合成または重合される。最後に、少なくとも1の所望のヌクレオチド変化は、対応する内生DNA中へ組み込まれ、これによって標的遺伝子座にてDNA分子のヌクレオチド配列中に1以上の変化が導入される。

【００７７】

更なる他の態様において、本開示は、標的にプライムされた逆転写によって、標的遺伝子座にてDNA分子のヌクレオチド配列中に1以上の変化を導入するための方法を提供するが、方法は、以下:(a)標的遺伝子座にてDNA分子を、i)核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)と逆転写酵素とを含むプライム編集因子、および(ii)所望のヌクレオチド変化を含むRT鋳型を含むガイドRNAに接触させること;(b)RT鋳型の標的にプライムされた逆転写に、所望のヌクレオチド変化を含む単鎖DNAを生成させること;(c)DNA修復および/または複製プロセスを通して標的遺伝子座にてDNA分子中への所望のヌクレオチド変化を組み込むこと、を含む。

【００７８】

ある態様において、内生DNA鎖を置き換えるステップは以下を含む:(i)単鎖DNAフラップを切断部位に隣接する内生DNA鎖とハイブリダイズさせることで、配列ミスマッチを創出すること;(ii)内生DNA鎖を切除すること;および(iii)ミスマッチを修復することで

、ＤＮＡの両鎖中に所望のヌクレオチド変化を含む所望の産物を形成すること。
【００７９】
種々の態様において、所望のヌクレオチド変化は1ヌクレオチド置換(例えば、トランジションまたはトランスバージョン変化)、欠失、または挿入であり得る。例えば、所望のヌクレオチド変化は、(1)Ｇ→Ｔの置換、(2)Ｇ→Ａの置換、(3)Ｇ→Ｃの置換、(4)Ｔ→Ｇの置換、(5)Ｔ→Ａの置換、(6)Ｔ→Ｃの置換、(7)Ｃ→Ｇの置換、(8)Ｃ→Ｔの置換、(9)Ｃ→Ａの置換、(10)Ａ→Ｔの置換、(11)Ａ→Ｇの置換、または(12)Ａ→Ｃの置換であり得る。
【００８０】
他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、(1)Ｇ:Ｃ塩基対をＴ:Ａ塩基対に、(2)Ｇ:Ｃ塩基対をＡ:Ｔ塩基対に、(3)Ｇ:Ｃ塩基対をＣ:Ｇ塩基対に、(4)Ｔ:Ａ塩基対をＧ:Ｃ塩基対に、(5)Ｔ:Ａ塩基対をＡ:Ｔ塩基対に、(6)Ｔ:Ａ塩基対をＣ:Ｇ塩基対に、(7)Ｃ:Ｇ塩基対をＧ:Ｃ塩基対に、(8)Ｃ:Ｇ塩基対をＴ:Ａ塩基対に、(9)Ｃ:Ｇ塩基対をＡ:Ｔ塩基対に、(10)Ａ:Ｔ塩基対をＴ:Ａ塩基対に、(11)Ａ:Ｔ塩基対をＧ:Ｃ塩基対に、または(12)Ａ:Ｔ塩基対をＣ:Ｇ塩基対に変換し得る。
【００８１】
なお他の態様において、方法は、挿入である所望のヌクレオチド変化を導入する。ある種のケースでは、挿入は長さが少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500ヌクレオチドである。
【００８２】
他の態様において、方法は、欠失である所望のヌクレオチド変化を導入する。ある種の他のケースでは、欠失は長さが少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500ヌクレオチドである。
【００８３】
種々の態様において、所望のヌクレオチド変化は疾患関連遺伝子を修正する。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;1型神経線維腫症;先天性爪肥厚症;フェニルケトン尿症;重症複合免疫不全;鎌状赤血球症;スミス・レムリ・オピッツ症候群;およびテイ・サックス病からなる群から選択される単一遺伝子障害に関連し得る。他の態様において、疾患関連遺伝子は:心臓病;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し得る。
【００８４】
本明細書に開示の方法は、ヌクレアーゼ不活性型(dead)Cas9(dCas9)、Cas9ニッカーゼ(nCas9)、またはヌクレアーゼ活性Cas9であるnapDNAbpを有する融合タンパク質を伴っていてもよい。他の態様において、napDNAbpおよび逆転写酵素は、単一の融合タンパク質としてはコードされていないが、むしろ別々の構築物中に提供され得る。よって、いくつかの態様において、逆転写酵素は(融合タンパク質としてよりむしろ)、napDNAbpに対しtransで提供され得る。
【００８５】
方法を伴う様々な態様において、napDNAbpは、配列番号26～61、75～76、126

、130、137、141、147、153、157、445、460、467および482～487(Cas9);(SpCas9);配列番号77～86(CP-Cas9);配列番号18～25および87～88(SpCas9);ならびに配列番号62～72(Cas12)のアミノ酸配列を含んでいてもよい。napDNAbpはまた、配列番号26～61、75～76、126、130、137、141、147、153、157、445、460、467および482～487(Cas9);(SpCas9);配列番号77～86(CP-Cas9);配列番号18～25および87～88(SpCas9);ならびに配列番号62～72(Cas12)のいずれ1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一のアミノ酸配列も含んでいてもよい。

【００８６】

方法を伴う様々な態様において、逆転写酵素は、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、235、454、471、516、662、700～716、739～742および766のアミノ酸配列のいずれか1つを含んでいてもよい。逆転写酵素はまた、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、235、454、471、516、662、700～716、739～742および766のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一のアミノ酸配列も含んでいてよい。

【００８７】

方法には、配列番号101～104、181～183、223～234、237～244、277、324～330、332、334、336、338、340、342、344、346、348、350、352、354、356、358、360、362、364、366、368、394、429～442、499～505、641～649、678～692、735～736、757～761、776～777、2997～3103、3113～3121、3305～3455、3479～3493、3522～3540、3549～3556、3628～3698、3755～3810、3874、3890～3901、3905～3911、3913～3929、および3972～3989のヌクレオチド配列、または少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも99%の配列同一性をそれに対して有するヌクレオチド配列を含むPEgRNAの使用が関わり得る。方法は、RNA伸長を3'端に含む伸長されたガイドRNAの使用を含み得、RNA伸長は逆転写鋳型配列を含む。

【００８８】

方法は、5'端にRNA伸長を含む伸長されたガイドRNAの使用を含み得、RNA伸長は逆転写鋳型配列を含む。

【００８９】

方法は、ガイドRNAの分子内の位置付けにRNA伸長を含む伸長されたガイドRNAの使用を含み得、RNA伸長は逆転写鋳型配列を含む。

【００９０】

方法は、長さが少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、または少なくとも500ヌクレオチドである1以上のRNA伸長を有する伸長されたガイドRNAの使用を含んでもよい。

【００９１】

上記の概念、および下に考察される追加の概念は、いずれの好適な組み合わせでも並べられ得ることが解されるはずである(ただし、本開示はこの点において限定されない)。さらに、本開示の他の利点および新規特色は、添付の図と併せて考慮すれば、以下の様々な非限定的態様の詳細な記載から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【００９２】

図面の簡単な記載

以下の図面は本明細書の一部を形成するものであって、これらの図面の1以上を、本明細書に提示される特定の態様の詳細な記載と組み合わせて参照することによってより良好に理解され得る、ある本開示の側面をさらに実証するために包含される。

【００９３】

【図１Ａ】図1Aは、伸長されたガイドRNA分子と複合したCas9タンパク質と融合した逆転写酵素を含む融合タンパク質を使用して、単一ヌクレオチドの変化、および/または挿入、および/または欠失をDNA分子(例として、ゲノム)中へ導入するための例示のプロセスの概略図を提供する。この態様において、ガイドRNAは、3'末にて伸長されていることで、逆転写酵素鋳型配列を包含する。概略図は、Cas9ニッカーゼと融合してガイドRNA(gRNA)と複合した逆転写酵素(RT)が、どのようにDNA標的部位に結合し、標的ヌクレオチドに隣接するPAM含有DNA鎖にニックを入れるのかを示す。RT酵素は、ニック入りDNAを、所望の編集をコードする新しいDNA鎖の合成のための鋳型として使用されるgRNAからのDNA合成のためのプライマーとして使用する。示される編集プロセスは、標的にプライムされた逆転写編集(TRT編集)、即ち「プライム編集」と称されてもよい。

【００９４】

【図１Ｂ】図1Bは、プライム編集因子複合体がより一般的に[napDNAbp]-[P]:PEgRNAまたは[P]-[napDNAbp]:PEgRNAとして表されているということを例外として、図1Aと同じ図表を提供している。式中、「P」はいずれかのポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)を言い、「napDNAbp」は核酸プログラム型DNA結合タンパク質(例えばSpCas9)を言い、「PEgRNA」はプライム編集ガイドRNAを言い、「]-[」は任意のリンカーを言う。他所、例えば図3A-3Gに記載されているとおり、PEgRNAはプライマー結合部位とDNA合成鋳型とを含む5'伸長アームを含む。示されてはいないが、PEgRNAの伸長アーム(すなわち、これはプライマー結合部位およびDNA合成鋳型を含む)はDNAまたはRNAであり得るということが企図される。この構成で企図される具体的なポリメラーゼはDNA合成鋳型の性質に依存するであろう。例えば、DNA合成鋳型がRNAである場合には、ポリメラーゼはRNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)であり得る。DNA合成鋳型がDNAである場合には、ポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。

【００９５】

【図１Ｃ】図1Cは、1ヌクレオチド変化および/または挿入および/または欠失をDNA分子(例えばゲノム)上に導入するための例示的プロセスの模式図を提供し、伸長されたガイドRNA分子との複合体としてCas9タンパク質に融合された逆転写酵素を含む融合タンパク質を用いる。この態様では、ガイドRNAは、逆転写酵素鋳型配列を包含するように5'端が伸長されている。模式図は、Cas9ニッカーゼに融合された逆転写酵素(RT)が、ガイドRNA(gRNA)との複合体として、どのようにしてDNA標的部位に結合し、標的ヌクレオチドに隣接するPAM含有DNA鎖へニックを入れるかを示している。RT酵素は、所望の編集をコードする新たなDNA鎖の合成のための鋳型として用いられるgRNAからのDNA合成のプライマーとして、ニッキングされたDNAを用いる。示されている編集プロセスは、プライム標的にプライムされた逆転写編集(TRT編集)または同等に「プライム編集」と言われ得る。

【００９６】

【図１Ｄ】図1Dは、プライム編集因子複合体がより一般に、[napDNAbp]-[P]:PEgRNAまたは[P]-[napDNAbp]:PEgRNAPEgRNAとして表されることを除いて、図1Cと同じ描写を提供するが、ここで「P」は、いずれのポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)を指し、「napDNAbp」は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(例として、SpCas9)を指し、および「PEgRNA」は、プライム編集ガイドRNAを指し、および「]-[」は、任意のリンカーを指す。他のどこか、例として図3A～3Gに記載のとおり、PEgRNAは、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型を含む3'伸長アームを含む。示されてはいないが、PEgRNAの伸長アーム(すなわち、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型を含む)

はDNAまたはRNAであり得ることが企図される。この立体配置において企図される具体的なポリメラーゼは、DNA合成鋳型の性質に依存するであろう。実例として、DNA合成鋳型がRNAであると、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)になり得る。DNA合成鋳型がDNAであると、ポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼになり得る。様々な態様において、PEgRNAは、DNAベースのDNA合成鋳型を組み込むように改変または合成され得る。

【００９７】

【図１Ｅ】図1Eは、合成された単DNAの鎖(所望のヌクレオチド変化を含む)が、所望のヌクレオチド変化がDNA中へ組み込まれるように、どのように分解されるのかという例示のプロセスを描く概略図である。示されるとおり、編集済鎖(または「変異誘発鎖」)の次の合成、内生鎖との平衡、内生鎖のフラップ切断、およびライゲーションは、内生DNA修復および/または複製プロセスの作用を通して、ミスマッチDNA二重鎖の分解後のDNA編集の組み込みに繋がる。

【００９８】

【図１Ｆ】図1Fは、「反対鎖(opposite strand)へのニック入れ」が図1Eの分解方法の中へ組み込まれることで、所望の産物・対・復元産物の形成を推進するのに役立ち得ることを示す概略図である。反対鎖のニック入れにおいて、第2のCas9/gRNA複合体は、最初にニックが入った鎖の反対鎖上に第2ニックを導入するのに使用される。これは、未編集鎖(すなわち、第2ニック部位を含有する鎖)を優先的に置き換えるために、内生細胞のDNA修復および/または複製プロセスを誘導する。

【００９９】

【図１Ｇ】図1Gは、伸長されたガイドRNAと複合体化された核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)を使用して、標的遺伝子座のDNA分子(例として、ゲノム)中へ単一ヌクレオチドの変化、および/または挿入、および/または欠失を導入するための例示のプロセスの別の概略図を提供する。このプロセスはプライム編集という態様として称されることもある。伸長されたガイドRNAは、ガイドRNAの3'末もしくは5'末にて、またはガイドRNA中の分子内のある場所にて伸長を含む。ステップ(a)において、napDNAbp/gRNA複合体はDNA分子に接触し、gRNAは標的遺伝子座へ結合するようにnapDNAbpをガイドする。ステップ(b)において、標的遺伝子座のDNA(Rループ鎖、またはPAM含有鎖、または非標的DNA鎖、またはプロトスペーサー鎖)の鎖の一方へニックが導入され(例として、ヌクレアーゼまたは化学剤によって)、これによって標的遺伝子座の鎖の一方に利用可能な3'末が創出される。ある態様において、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配列とはハイブリダイズされない鎖に創出される。ステップ(c)において、3'末DNA鎖は、逆転写をプライムするためにガイドRNAの伸長された部分と相互作用する。いくつかの態様において、3'末DNA鎖は、ガイドRNAの伸長された部分上の特定のRTプライム配列とハイブリダイズする。ステップ(d)において、逆転写酵素が導入されて、プライムされた部位の3'末からガイドRNAの3'末へDNAの単鎖を合成する。これは、所望のヌクレオチド変化(例として、単一の塩基変化、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせ)を含む単鎖DNAフラップを形成する。ステップ(e)において、napDNAbpおよびガイドRNAは放出される。ステップ(f)および(g)は、所望のヌクレオチド変化が標的遺伝子座中へ組み込まれるように、単鎖DNAフラップの分解に関する。このプロセスは、一旦3'単鎖DNAフラップが侵入して他の鎖上の相補的な配列とハイブリダイズすると、形成された対応の5'内生DNAフラップを除去することによって、所望の産物形成が推進され得る。プロセスはまた、図1Fに例示されるとおり、第2鎖へニックが入れられた産物の形成へも推進され得る。このプロセスは、以下の遺伝子変化:トランスバージョン、トランジション、欠失、および挿入のうち少なくとも1またはそれ以上を導入してもよい。

【０１００】

【図１Ｈ】図1Hは、本明細書に記載の、プライム編集プロセスに起こり得る遺伝子変化の型を描く概略図である。プライム編集によって達成され得るヌクレオチド変化の型は、

欠失(短いおよび長い欠失を包含する)、単一のヌクレオチド変化(トランジションおよびトランスバージョンを包含する)、ならびに挿入(短いおよび長いものを包含する)を包含する。

【０１０１】

【図１Ｉ】図1Iは、PE3b(PE3b=PE2プライム編集因子融合タンパク質+PEgRNA+第2鎖へニックを入れるガイドRNA)によって例示される、一時的な(temporal)第2鎖へのニック入れを描く概略図である。一時的な第2鎖へのニック入れは、所望の編集済産物の形成を容易にするための、第2鎖へのニック入れのバリアントである。「一時的な」という用語は、未編集鎖への第2鎖ニックが、所望の編集が編集済鎖に組み入れられた後にしか生じないという事実を指す。これは、二本鎖DNA切断へ繋がる両鎖上の同時のニックを回避する。

【０１０２】

【図１Ｊ－１Ｋ】図1J～1Kは、napDNAbp(例として、SpCas9ニッカーゼ)を、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)などのいずれのプログラム型ヌクレアーゼドメインにも置き換える、本明細書に企図されるプライム編集のバリエーションを描く。そのため、好適なヌクレアーゼは核酸標的分子(ガイドRNAなど)によって必ずしも「プログラムされる(programmed)」必要はないが、むしろ、とりわけヌクレアーゼなどのDNA結合ドメインの特異性を定義することによってプログラムされてもよいことが企図される。ちょうどnapDNAbp部分とのプライム編集と同じように、代替プログラム型ヌクレアーゼは、標的DNAの一方の鎖のみが切られるように修飾されることが好ましい。換言すれば、プログラム型ヌクレアーゼは、好ましくは、ニッカーゼとして機能するはずである。一旦プログラム型ヌクレアーゼが選択されると(例として、ZFNまたはTALEN)、追加の機能は改変されて、それがプライム編集様機序に従って作動することができる系になってもよい。例えば、プログラム型ヌクレアーゼは、これとRNAまたはDNAの伸長アームとを(例として、化学的リンカーを介して)カップリングすることによって修飾されてもよく、ここで伸長アームは、プライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鋳型を含む。プログラム型ヌクレアーゼはまた、ポリメラーゼとも(例として、化学的リンカーまたはアミノ酸リンカーを介して)カップリングされてもよいが、前記ポリメラーゼの性質は、伸長アームがDNAまたはRNAであるかに依存するであろう。RNA伸長アームのケースにおいて、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伸長アームのケースにおいて、ポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼ(例として、Pol I、Pol II、もしくはPol IIIを包含する原核生物のポリメラーゼ、またはPol a、Pol b、Pol g、Pol d、Pol e、もしくはPol zを包含する真核生物のポリメラーゼ)であり得る。系はまた、プログラム型ヌクレアーゼとの融合体として加えられるか、または反応全体を容易にするためにtransで加えられた他の機能も包含していてもよい(例として、(a)DNAを切断部位にて巻き戻すことで、プライマーとして利用可能な3'末をもつ切断鎖を作製する、ヘリカーゼ、(b)切断鎖上の内生鎖を除去することで、内生鎖の合成された鎖との置き換えへの反応を推進するのに役立つ、フラップエンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)、または(c)反対鎖上に第2部位ニックを創出する、nCas9:gRNA複合体(これは非編集鎖の好ましい細胞修復を通した合成修復の取り入れを推進するのに役立つこともある))。napDNAbpで編集をプライムする類似したやり方において、別様なプログラム型ヌクレアーゼとのかかる複合体は、合成し、次いで、着目した編集を持つ新しく合成されたDNAの置き換え鎖をDNAの標的部位中へ永続的に組み入れるのに使用され得る。

【０１０３】

【図１Ｌ】図1Lは、一態様において、プライム編集によって編集されてもよい標的DNAの解剖学的な特色(anatomical features)を描く。標的DNAは「非標的鎖」および「標的鎖」を含む。標的鎖は、PAM部位(このケースにおいては、標準的なSpCas9ベースのプライム編集因子によって認識されるNGG)を認識するプライム編集因子複合体のPEgRNAのスペーサーとアニールされるようになる鎖である。標的鎖はまた、「非PAM鎖」

または「非編集鎖」とも称されることがある。これに反して、非標的鎖(すなわち、プロトスペーサーおよびNGGのPAM配列を含有する鎖)は、「PAM鎖」または「編集鎖」と称されることもある。様々な態様において、PE複合体(例として、SpCas9ベースのPEでの)のニック部位は、PAM鎖上のプロトスペーサー中にあるであろう。ニックの場所は、PEを形成する具体的なCas9の特徴であろう。例えば、SpCas9ベースのPEであると、ニック部位は、塩基3(PAM配列の位置1と比べて「-3」位置)と4(PAM配列の位置1と比べて「-4」位置)との間のホスホジエステル結合中にある。プロトスペーサー中のニック部位は、以下の図に見られるとおりPEgRNAの伸長アームのプライマー結合部位と複合体化する遊離の3'ヒドロキシル基を形成し、PEgRNAの伸長アームのDNA合成鋳型をコードするDNAの単鎖の重合を始める基質を提供する。この重合反応は5'→3'方向に、PE融合タンパク質のポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によって触媒される。重合は、gRNAコアに達する前に(例として、PEの重合活性を終止するよう機能する重合終止シグナルまたは2次構造の包含によって)終止し、ニック入りのPAM鎖の元の3'ヒドロキシル基から伸長される単鎖DNAフラップを産生する。DNA合成鋳型は、PAM鎖上のニック部位のすぐ後に続く内生DNAの5'末の単鎖と相同な単鎖DNAをコードしており、所望のヌクレオチド変化(例として、単一塩基の置換、挿入、欠失、逆位)を組み入れる。所望の編集の位置は、PAM鎖上のニック部位の下流に続くいずれの位置にもあり得、位置+1、+2、+3、+4(PAM部位の開始)、+5(PAM部位の位置2)、+6(PAM部位の位置3)、+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、+51、+52、+53、+54、+55、+56、+57、+58、+59、+60、+61、+62、+63、+64、+65、+66、+67、+68、+69、+70、+71、+72、+73、+74、+75、+76、+77、+78、+79、+80、+81、+82、+83、+84、+85、+86、+87、+88、+89、+90、+91、+92、+93、+94、+95、+96、+97、+98、+99、+100、+101、+102、+103、+104、+105、+106、+107、+108、+109、+110、+111、+112、+113、+114、+115、+116、+117、+118、+119、+120、+ 121、+122、+123、+124、+125、+126、+127、+128、+129、+130、+131、+132、+133、+134、+135、+136、+137、+138、+139、+140、+141、+142、+143、+144、+145、+146、+147、+148、+149、もしくは+150、またはこれ以上(ニック部位の下流位置に対して)を包含し得る。一旦3'末単鎖DNA(着目する編集を含有する)が内生5'末単鎖DNAを置き換えると、DNA修復および複製プロセスは、PAM鎖上の編集部位の永続的な組み入れを、次いで編集部位に存在する非PAM鎖上のミスマッチの修正をもたらすであろう。このように、編集は、標的DNA部位上のDNAの両鎖へ広がるであろう。「編集済鎖」および「非編集済」鎖への言及が単に、PE機序に関与するDNAの鎖を正確に記述する(delineate)ことを意図するに過ぎないことは解されるであろう。「編集済鎖」は、ニック部位のすぐ下流での5'末の単鎖DNAの、所望の編集を含有する合成された3'末の単鎖DNAとの置き換えによって初めて編集されるようになる鎖である。「非編集済」鎖は編集済鎖との対の鎖であるが、これ自身もまた、修復および/または複製を通して、編集済鎖に相補的になるよう編集(とりわけ、着目する編集)がなされるようになる。

【０１０４】

【図１Ｍ】図1Mは、標的DNA、プライム編集因子複合体、およびPEgRNAと標的DNAとの間の相互作用の解剖学的な特色を示すプライム編集の機序を描く。第1に、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)およびnapDNAbp(例として、SpCas9ニッカーゼ、例として、HNHヌクレアーゼドメイン中の不活性化突然変異(例として、H840A)またはRuvCヌクレアーゼドメイン中の活性化突然変異(D10A)を有するSpCas9)を有する融合タンパク質を含むプライム編集因子は、PEgRNAおよび編集されるべき標的DNAを有するDNAと複合体化されている。PEgRNAは、スペーサー、gRNAコア(またgRNA骨格もしくはgRNA主鎖としても知られている)(これはnapDNAbpへ結合する)、および伸長アーム

を含む。伸長アームは、3'末、5'末に、またはPEgRNA分子内のどこかにあり得る。示されるとおり、伸長アームは、PEgRNAの3'末にある。伸長アームは、3'→5'方向において、PAM鎖上のニック部位のすぐ後に続く5'末の単鎖DNAと相同である、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型(着目する編集と相同領域(すなわち、相同アーム)との両方を含む)を含む。示されるとおり、一旦ニックが導入され、これによってニック部位のすぐ上流に遊離の3'ヒドロキシル基が産生されると、PAM鎖上のニック部位のすぐ上流の領域は、「プライマー結合部位」と称される伸長アームの3'末にて相補的な配列とアニールし、利用可能な3'ヒドロキシル末をもつ短い二本鎖の領域を創出するが、これによってプライム編集因子複合体のポリメラーゼのための基質が形成される。次いで、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)は、DNAの鎖として、3'ヒドロキシル末から伸長アームの末まで重合する。単鎖DNAの配列はDNA合成鋳型によってコードされており、これは、新しいDNAを合成するポリメラーゼによって「読まれる」伸長アームの一部(すなわち、プライマー結合部位を排除する)である。この重合は、最初のニック部位の元の3'ヒドロキシル末の配列まで有効に伸長する。DNA合成鋳型は、所望の編集のみならず、PAM鎖上のニック部位のすぐ下流の内生DNAの単鎖に相同の領域もまた含むDNAの単鎖をコードする。次に、コードされる3'末のDNAの単鎖(すなわち、3'単鎖DNAフラップ)は、PAM鎖上のニック部位のすぐ下流の、対応する相同の内生5'末のDNAの単鎖に取って代わり、5'末の単鎖DNAフラップを有するDNA中間体を形成するが、これは細胞によって(例として、フラップエンドヌクレアーゼによって)除去される。内生5'末の単鎖DNAフラップの相補体とアニールする3'末の単鎖DNAフラップは、5'DNAフラップが除去された後、内生鎖とライゲーションされる。3'末の単鎖DNAフラップ中の所望の編集は、たった今アニールされてライゲーションされたが、相補鎖とのミスマッチを形成し、DNA修復および/または一連の複製を経て、これによって両鎖上に所望の編集が永続的に組み入れられる。

【０１０５】

【図２】図2は、本明細書に記載のプライム編集因子に用いられ得る3つのCas複合体(SpCas9、SaCas9、およびLbCas12a)と、それらのPAM、gRNA、およびDNA切断特色とを示している。図はSpCas9、SaCas9、およびLbCas12aが関わる複合体のデザインを示している。

【０１０６】

【図３】図3A～3Fは、操作された5'プライム編集因子gRNA(図3A)、3'プライム編集因子gRNA(図3B)、および分子内の伸長(図3C)のデザインを示している。伸長されたガイドRNA(または伸長されたgRNA)は本願においてはPEgRNAまたは「プライム編集ガイドRNA」ともまた言われ得る。図3Dおよび図3Eは夫々3'および5'プライム編集因子gRNA(PEgRNA)の追加の態様を提供する。図3Fは標的DNA配列との3'端プライム編集因子ガイドRNAの間の相互作用を例解している。図3A～3Cの態様は、3'、5'、および分子内のバージョンの伸長された部分における逆転写鋳型配列(すなわち、または指示されているとおりより幅広くDNA合成鋳型と言われる。なぜなら、RTはプライム編集因子という文脈において用いられ得るポリメラーゼの唯一の型であるからである)、プライマー結合部位、および任意のリンカー配列の例示の配置、ならびにスペーサーおよびコア領域の一般的な配置を図示する。開示されるプライム編集プロセスは、伸長されたガイドRNAのこれらの構成に限定されない。図3Dの態様は、本願において企図される例示のPEgRNAの構造を提供する。PEgRNAは、5'→3'の方向で順序付けられた3つの主な構成要素構成要素、つまり:スペーサー、gRNAコア、および3'端の伸長アームを含む。伸長アームは、さらに、5'→3'方向に次の構造要素、つまり:プライマー結合部位(A)、編集鋳型(B)、および相同アーム(C)に分けられ得る。加えて、PEgRNAは任意の3'端修飾領域(e1)および任意の5'端修飾領域(e2)を含み得る。なお、さらに、PEgRNAは転写終結シグナルをPEgRNAの3'端に含み得る(図示されていない)。これらの構造要素はさらに本願において定められる。PEgRNAの構造の図示は限定することを意味されず、要素の配置のバリエーションを包摂する。例えば、任意の配列修飾(e1)および(e2)は、示されている

他の領域のいずれかの内にまたは間に位置取り得る。3'および5'端に位置付けられることに限定されない。PEgRNAは、ある態様において、ヘアピン、ステムループ、トウループ、RNA結合タンパク質動員ドメイン(例えば、MS2cpタンパク質を動員および結合するMS2アプタマー)などだがこれらに限定されない二次RNA構造を含み得る。例えば、かかる二次構造は、スペーサー、gRNAコア、または伸長アーム内に、特にe1および/またはe2修飾領域内に位置し得る。二次RNA構造に加えて、PEgRNAは(例えばe1および/またはe2修飾領域内に)化学的リンカーまたはポリ(N)リンカーもしくはテールを含み得る。ここで、「N」はいずれかの核酸塩基であり得る。いくつかの態様では(例えば、図72(c)に示されているとおり)、化学的リンカーはsgRNA骨格またはコアの逆転写を防止するように機能し得る。加えて、ある種の態様では(例えば図72(c)を見よ)、伸長アーム(3)はRNAまたはDNAから構成され得、および/または1以上の核酸塩基アナログを包含し得る(例えば、これは温度レジリエンスなどの機能性を追加し得る)。なお、さらに、伸長アーム(3)の向きは、天然の5'→3'の方向であり得るか、または対向する向きで3'→5'の方向に(総体的なPEgRNA分子の向きに対して相対的に)合成され得る。当業者は、伸長アームの核酸材料の性質(すなわちDNAまたはRNA)に依存して、プライム編集への使用のための適当なDNAポリメラーゼを選択する能力があるであろうということもまた注意される。これは、所望の編集を包含する所望の鋳型によってコードされる3'一本鎖DNAフラップを合成するために、napDNAbpとの融合体として、または別個の部分としてトランスで提供されて、どちらかで実装され得る。例えば、伸長アームがRNAである場合には、DNAポリメラーゼは、逆転写酵素またはいずれかの他の好適なRNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。しかしながら、伸長アームがDNAである場合には、DNAポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。種々の態様において、DNAポリメラーゼの提供はトランスであり得、例えばRNA－タンパク質動員ドメイン(例えば、PEgRNA上に組み入れされたMS2ヘアピン(例えば、e1もしくはe2領域にまたは他所に)およびDNAポリメラーゼに融合されたMS2cpタンパク質。それによってDNAポリメラーゼをPEgRNAに共局在させる)の使用による。プライマー結合部位は、一般的には、所望の編集を包含するもたらされる3'一本鎖DNAフラップをコードするためのDNAポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)によって用いられる鋳型の一部を形成しないということもまた注意される。それゆえに、「DNA合成鋳型」という指定は、編集とプライム編集DNA合成の3’一本鎖DNA鎖産物によって置き換えられる5’の内生一本鎖DNAフラップに対する相同領域とを含有する所望の3'一本鎖DNAフラップをコードするための、DNAポリメラーゼによって鋳型として用いられる伸長アーム(3)の領域または部分を言う。いくつかの態様では、DNA合成鋳型は「編集鋳型」および「相同アーム」または1以上の相同アームを例えば編集鋳型の前および後に包含する。編集鋳型は1ヌクレオチド置換ほども小さくあり得るか、またはそれはDNAの挿入もしくは逆位であり得る。加えて、編集鋳型は欠失をもまた包含し得、これは所望の欠失を含有する相同アームをコードすることによって操作され得る。他の態様において、DNA合成鋳型はe2領域またはその部分をもまた包含し得る。例えば、e2領域がDNAポリメラーゼ活性の終結を引き起こす二次構造を含む場合には、e2領域のいずれかの部分が実際にDNA上にコードされる前に、DNAポリメラーゼ機能が終結するであろうということが可能である。e2領域のいくつかまたはさらには全てがDNA上にコードされるであろうということもまた可能である。e2のどれくらい多くが実際に鋳型として用いられるのかは、その構成とその構成がDNAポリメラーゼ機能を分断するかどうかとに依存するであろう。

【０１０７】

【図３Ｅ】図3Eの態様は本願において企図される別のPEgRNAの構造を提供する。PEgRNAは、5'→3'の方向で順序付けられた3つの主な構成要素構成要素、つまり:スペーサー、gRNAコア、および3'端の伸長アームを含む。伸長アームは、さらに、5'→3'の方向で次の構造要素、つまり:プライマー結合部位(A)、編集鋳型(B)、および相同アーム(C)に分けられ得る。加えて、PEgRNAは任意の3'端修飾領域(e1)および任意の5'端修飾領域(e2)を含み得る。なお、さらに、PEgRNAはPEgRNAの3'端に転写終結シグナルを

含み得る(図示されていない)。これらの構造要素はさらに本願において定められる。PEgRNAの構造の図示は限定することを意味されず、要素の配置のバリエーションを包摂する。例えば、任意の配列修飾(e1)および(e2)は示されている他の領域のいずれかの内にまたは間に位置取り得る。3'および5'端に位置付けられることに限定されない。PEgRNAは、ある態様において、ヘアピン、ステムループ、トウループ、RNA結合タンパク質動員ドメイン(例えば、MS2cpタンパク質を動員および結合するMS2アプタマー)などだがこれらに限定されない二次RNA構造を含み得る。これらの二次構造はPEgRNA分子上のどこかに位置取り得る。例えば、かかる二次構造は、スペーサー、gRNAコア、または伸長アーム内に、特にe1および/またはe2修飾領域内に位置し得る。二次RNA構造に加えて、PEgRNAは(例えば、e1および/またはe2修飾領域内に)化学的リンカーまたはポリ(N)リンカーもしくはテールを含み得る。ここで、「N」はいずれかの核酸塩基であり得る。いくつかの態様では(例えば、図72(c)に示されているとおり)、化学的リンカーはsgRNA骨格またはコアの逆転写を防止するように機能し得る。加えて、ある種の態様では(例えば、図72(c)を見よ)、伸長アーム(3)はRNAもしくはDNAからなり得、および/または1以上の核酸塩基アナログを包含し得る(例えば、これは温度レジリエンスなどの機能性を追加し得る)。なお、さらに、伸長アーム(3)の向きは天然の5'→3'の方向であり得るか、または対向する向きで3'→5'の方向に(総体的なPEgRNA分子の向きに対して相対的に)合成され得る。当業者は、伸長アームの核酸材料の性質(すなわちDNAまたはRNA)に依存して、プライム編集への使用のための適当なDNAポリメラーゼを選択する能力があるであろうということもまた注意される。これは、所望の編集を包含する所望の鋳型によってコードされる3'一本鎖DNAフラップを合成するために、napDNAbpとの融合体として、または別個の部分としてトランスで提供されて、どちらかで実装され得る。例えば、伸長アームがRNAである場合には、DNAポリメラーゼは、逆転写酵素またはいずれかの他の好適なRNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。しかしながら、伸長アームがDNAである場合には、DNAポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。種々の態様において、DNAポリメラーゼの提供はトランスであり得、例えばRNA－タンパク質動員ドメイン(例えば、PEgRNA上に組み入れされたMS2ヘアピン(例えば、e1もしくはe2領域にまたは他所に)およびDNAポリメラーゼに融合されたMS2cpタンパク質。それによってDNAポリメラーゼをPEgRNAに共局在させる)の使用による。プライマー結合部位は、一般的には、所望の編集を包含するもたらされる3'一本鎖DNAフラップをコードするためのDNAポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)によって用いられる鋳型の一部を形成しないということもまた注意される。それゆえに、「DNA合成鋳型」という指定は、編集とプライム編集DNA合成の3’一本鎖DNA鎖産物によって置き換えられる5’の内生一本鎖DNAフラップに対する相同領域とを含有する所望の3'一本鎖DNAフラップをコードするための、DNAポリメラーゼによって鋳型として用いられる伸長アーム(3)の領域または部分を言う。いくつかの態様では、DNA合成鋳型は「編集鋳型」および「相同アーム」または1以上の相同アームを例えば編集鋳型の前および後に包含する。編集鋳型は1ヌクレオチド置換ほども小さくあり得るか、またはそれはDNAの挿入もしくは逆位であり得る。加えて、編集鋳型は欠失をもまた包含し得、これは所望の欠失を含有する相同アームをコードすることによって操作され得る。他の態様において、DNA合成鋳型はe2領域またはその部分をもまた包含し得る。例えば、e2領域がDNAポリメラーゼ活性の終結を引き起こす二次構造を含む場合には、e2領域のいずれかの部分が実際にDNA上にコードされる前に、DNAポリメラーゼ機能が終結するであろうということが可能である。e2領域のいくつかまたはさらには全てがDNA上にコードされるであろうということもまた可能である。e2のどれくらい多くが実際に鋳型として用いられるのかは、その構成とその構成がDNAポリメラーゼ機能を分断するかどうかとに依存するであろう。

【０１０８】

【図３Ｆ】図3Fの模式図は、二本鎖DNAの標的部位との典型的なPEgRNAの相互作用と、目当ての遺伝子変化を含有する3'一本鎖DNAフラップの付随的生成とを図示する。二本鎖DNAは3'→5'の向きの上側鎖(すなわち、標的鎖)と5'→3'方向の下方の鎖(すなわち

、PAM鎖または非標的鎖)とによって示されている。上側の鎖は「プロトスペーサー」の相補体およびPAM配列の相補体を含み、「標的鎖」と言われる。なぜなら、それは、PEgRNAのスペーサーによる標的であるかつそれにアニールする鎖であるからである。それはPAM配列(例えばNGG)およびプロトスペーサーを含有するので、相補的な下方の鎖は、「非標的鎖」または「PAM鎖」または「プロトスペーサー鎖」と言われる。示されてはいないが、図示されているPEgRNAはプライム編集因子融合タンパク質のCas9または同等のドメインと複合体化するであろう。模式図に示されているとおり、PEgRNAのスペーサーは標的鎖上のプロトスペーサーの相補領域にアニールする。この相互作用はスペーサーRNAとプロトスペーサーDNAの相補体との間のDNA/RNAハイブリッドを形成し、プロトスペーサー上のRループの形成を誘導する。本願の他所において教示されるとおり、Cas9タンパク質(示されていない)は、それから、示されているとおり非標的鎖上にニックを誘導する。これは、それから、ニック部位の直ちに上流において3'ssDNAフラップ領域の形成に至り、これは、*z*に従ってプライマー結合部位においてPEgRNAの3'端と相互作用する。ssDNAフラップの3'端(すなわち、逆転写酵素プライマー配列)はPEgRNA上のプライマー結合部位(A)にアニーリングし、それによって逆転写酵素をプライムする。次に、逆転写酵素(例えば、トランスで提供されるか、またはCas9構築物に取り付けられた融合タンパク質としてシスで提供される)は、それから、DNA合成鋳型(編集鋳型(B)および相同アーム(C)を包含する)によってコードされるDNAの一本鎖を重合する。重合は伸長アームの5'端の方へ連続する。ssDNAの重合した鎖はssDNA 3'端フラップを形成し、これは他所に記載するとおり(例えば、図1Gに示されているとおり)内生DNAに侵入し、対応する内生鎖を押し除け(これは内生DNAの5'端のDNAフラップとして除去される)、所望のヌクレオチド編集(1ヌクレオチド塩基対変化、欠失、挿入(遺伝子丸ごとを包含する)を天然に存在するDNA修復/複製ラウンドによって組み入れる。

【０１０９】

【図３Ｇ】図3Gは、本願において企図されるプライム編集のさらに別の態様を図示する。特に、上側の模式図はプライム編集因子(PE)の1つの態様を図示する。これはnapDNAbp(例えば、SpCas9)およびポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)の融合タンパク質を含み、これらはリンカーによって連結されている。PEは、PEgRNAのgRNAコアに結合することによってPEgRNAとの複合体を形成する。示されている態様では、PEgRNAは3'伸長アームを備え、これは、3'端に始まって、プライマー結合部位(PBS)、次にDNA合成鋳型を含む。下側の模式図は、「トランスプライム編集因子(tPE)」と言われるプライム編集因子のバリアントを図示する。この態様では、DNA合成鋳型およびPBSはPEgRNAからデカップリングされ、トランスプライム編集因子RNA鋳型(「tPERT」)と言われる別個の分子によって提示される。これはRNA-タンパク質動員ドメイン(例えば、MS2ヘアピン)を含む。PEそれ自体は、rPERT動員タンパク質(「RP」)への融合体を含むようにさらに改変される。これはRNA-タンパク質動員ドメインを特異的に認識および結合するタンパク質である。RNA-タンパク質動員ドメインがMS2ヘアピンである例では、対応するrPERT動員タンパク質はMS2タグ付けシステムのMS2cpであり得る。MS2タグ付けシステムは、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」または「MS2アプタマー」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。トランスプライム編集のケースでは、RP-PE:gRNA複合体は、PE:gRNA複合体と共局在するように適当なRNA-タンパク質動員ドメインを有するtPERTを「動員」し、それによって、図3Hに図示されている例に示されているとおりプライム編集への使用のためのPBSおよびDNA合成鋳型をトランスで提供する。

【０１１０】

【図３Ｈ】図3Hはトランスプライム編集のプロセスを図示する。この態様では、トランスプライム編集因子は、MS2cpタンパク質(すなわち、MS2アプタマーを認識および結合する型の動員タンパク質)に融合されているかつsgRNA(すなわち、PEgRNAと対比して標準ガイドRNA)と複合体化されている「PE2」プライム編集因子(すなわち、Cas9(H

840A)およびバリアントMMLV RTの融合体)を含む。トランスプライム編集因子は標的DNAに結合し、非標的鎖へニックを入れる。MS2cpタンパク質はtPERT分子上のRNA-タンパク質動員ドメインとの特異的相互作用によってトランスでtPERTを動員する。tPERTはトランスプライム編集因子と共局在するようになり、それによって、逆転写酵素ポリメラーゼによる使用のためのPBSおよびDNA合成鋳型機能をトランスで提供して、3'端を有するかつDNA合成鋳型によってコードされる所望の遺伝子情報を含有する一本鎖DNAフラップを合成する。

【０１１１】

【図４Ａ】図4A～4Eは、in vitroでのTPRTアッセイ(すなわち、プライム編集アッセイ)を実証する。図4Aは、蛍光標識DNA基質、RT酵素によるgRNA鋳型の伸長、PAGEの概略図である。

【図４Ｂ－Ｃ】図4Bは、予めニックが入った(pre-nicked)基質、dCas9、および異なる合成鋳型長の5'伸長gRNAでのTPRT(すなわち、プライム編集)を示す。図4Cは、Cas9不在下の、予めニックが入ったDNA基質とのRT反応を示す。

【図４Ｄ－Ｅ】図4Dは、Cas9(H840A)および5'伸長gRNAとの、全長dsDNA基質に対するTPRT(すなわち、プライム編集)を示す。図4Eは、予めニックが入った全長dsDNA基質との3'伸長gRNA鋳型を示す。すべての反応にはM-MLV RTが存在する。

【０１１２】

【図５】図5は、合成鋳型長を変動させた5'伸長gRNAを使用する、in vitroでの検証結果(validations)を示す。蛍光標識(Cy5)DNA標的を基質として使用し、この実験一式において予めニックを入れた。これらの実験において使用されたCas9は触媒不活性型Cas9(dCas9)であり、使用されたRTは、モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)に由来する商用RTであるSuperscript IIIである。dCas9:gRNA複合体を、精製された構成要素から形成した。次いで、蛍光標識DNA基質をdNTPsおよびRT酵素とともに加えた。37℃での1時間のインキュベーション後、反応産物を変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分析した。ゲル画像は、元のDNA鎖～逆転写鋳型長と一致する長さの伸長を示す。

【０１１３】

【図６】図6は、合成鋳型長を変動させた5'伸長gRNAを使用する、in vitroでの検証結果を示すが、これは図5に示されるものと酷似している。しかしながら、DNA基質は、この実験一式においてニックは予め入っていない。これらの実験に使用されたCas9はCas9ニッカーゼ(SpyCas9 H840A突然変異体)であり、使用されたRTは、モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)に由来する商用RTであるSuperscript IIIである。反応産物を変性尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって分析した。ゲルに示されるとおり、ニッカーゼは、標準gRNAが使用されたとき、DNA鎖を効率的に切断する(gRNA_0、レーン3)。

【０１１４】

【図７】図7は、3'伸長がDNA合成を裏付け有意にCas9ニッカーゼ活性を生じさせないことを実証する。予めニックが入った基質(黒色矢印)は、dCas9またはCas9ニッカーゼのいずれかが使用されたとき、ほぼ定量的にRT産物へ変換される(レーン4および5)。50%超のRT産物への変換(赤色矢印)が全長基質で観察される(レーン3)。Cas9ニッカーゼ(SpyCas9 H840A突然変異体)、触媒不活性型Cas9(dCas9)、およびSuperscript III(モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)に由来する商用RT)を使用する。

【０１１５】

【図８】図8は、RT反応が優先してgRNAにcisで生じる(同じ複合体中で結合される)かを決定するために使用された二色(dual color)実験を実証する。2つ別々の実験を5'伸長gRNAおよび3'伸長gRNAについて行った。産物をPAGEによって分析した。産物比率は(Cy3cis/Cy3trans)/(Cy5trans/Cy5cis)として算出した。

【０１１６】

【図９Ａ－Ｂ】図9A～9Dは、フラップモデル基質を実証する。図9Aは、フラップ特異

的(-directed)変異誘発のための二重FPレポーターを示す。図9Bは、HEK細胞中の停止コドン修復を示す。

【図９Ｃ－Ｄ】図9Cは、フラップ修復後に配列決定された(sequenced)酵母クローンを示す。図9Dは、ヒト細胞中の異なるフラップ特色の試験を示す。

【０１１７】

【図１０】図10は、プラスミド基質上のプライム編集を実証する。二重蛍光レポータープラスミドを酵母(S.cerevisiae)発現のために構築した。酵母中のこの構築物の発現は、GFPのみを産生する。in vitroでのプライム編集反応は点突然変異を誘導し、親プラスミド、またはin vitroでCas9(H840A)によってニックが入れられたプラスミドを酵母中へ形質転換する。コロニーは蛍光画像化によって可視化される。酵母二重FPプラスミド形質転換体が示されている。親プラスミドまたはin vitroでCas9(H840A)にニックが入ったプラスミドを形質展開することは、緑色GFP発現コロニーのみをもたらす。5'伸長gRNAまたは3'伸長gRNAでのプライム編集反応は、緑色および黄色の混合コロニーを産生する。後者はGFPとmCherryとの両方を発現する。より多くの黄色コロニーは3'伸長gRNAで観察される。停止コドンを含有しない陽性対照も示されていない。

【０１１８】

【図１１】図11は、図10の実験と同様のプラスミド基質上のプライム編集を示すが、停止コドン中に点突然変異を組み入れる代わりに、プライム編集は、フレームシフト突然変異を修復して下流のmCherryの合成を可能にさせる単一ヌクレオチドの挿入(左)または欠失(右)を組み入れる。両実験ともに3'伸長gRNAsを使用した。

【０１１９】

【図１２】図12は、サンガー(Sanger)配列決定によって特徴付けられる、プラスミド基質上のプライム編集の編集産物を示す。TRT形質転換からのコロニーを個々に選択し、サンガー配列決定によって分析した。正確な編集が選択コロニーを配列決定することによって観察された。緑色コロニーは元のDNA配列をもつプラスミドを含有していたのに対し、黄色コロニーはプライム編集gRNAによってデザインされた正確な突然変異を含有していた。他の点突然変異またはインデルは一切観察されなかった。

【０１２０】

【図１３】図13は、新しいプライム編集技術の潜在的な範囲を示し、デアミナーゼ媒介塩基編集技術との比較を示す。

【０１２１】

【図１４】図14は、ヒト細胞における編集の概略図を示す。

【０１２２】

【図１５】図15は、gRNA中のプライマー結合部位の伸長を実証する。

【０１２３】

【図１６】図16は、隣接標的化(adjacent targeting)のためにトランケートされたgRNAを示す。

【０１２４】

【図１７Ａ－Ｃ】図17A～17Cは、ヒト胚腎臓(HEK)細胞における構成要素のトランスフェクション後の標的ヌクレオチドでの%T→A変換を表示するグラフである。図17Aは、野生型MLV逆転写酵素のCas9(H840A)ニッカーゼ(32アミノ酸リンカー)へのN末融合を使用した結果を提示するデータを示す。図17Bは、RT酵素のC末融合を別にすれば図17Aと同様である。図17Cは、図17Aと同様であるが、MLV RTとCas9との間のリンカーが32アミノ酸の代わりに60アミノ酸長である。

【０１２５】

【図１８】図18は、ハイスループットアンプリコン配列決定によるHEK3部位での高純度T→A編集を示す。配列決定分析の出力は、編集済細胞の最も豊富な遺伝子型を表示する。

【０１２６】

【図１９】図19は、インデル比率(青色バー)と並んで標的ヌクレオチドでの編集効率(オ

レンジ色バー)を示す。WTは野生型MLV RT酵素を指す。突然変異酵素(M1～M4)は、右へ列挙された突然変異を含有する。編集比率をゲノムDNAアンプリコンのハイスループット配列決定によって定量化した。

【０１２７】

【図２０】図20は、単鎖ニックが標的ヌクレオチドに近接する相補的なDNA鎖中に導入されたときの標的ヌクレオチドの編集効率を示す。標的ヌクレオチドから様々な間隔にてニックを入れるのを試験した(三角形)。標的塩基対(青色バー)での編集効率が、インデル形成比率と並んで示される(オレンジ色バー)。「なし」の例は、相補鎖へニックを入れるガイドRNAを含有しない。編集比率をゲノムDNAアンプリコンのハイスループット配列決定によって定量化した。

【０１２８】

【図２１】図21は、所望のT→Aトランスバージョン突然変異および他の主なゲノム編集副産物の全般的な非存在を示す、処理されたハイスループット配列決定データを実証する。

【０１２９】

【図２２】図22は、伸長されたガイドRNAと複合体化された核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)を使用し、エラーを起こしやすい逆転写酵素で、標的変異誘発(targeted mutagenesis)を標的遺伝子座上に行う(すなわち、エラーを起こしやすいRTでプライム編集する)ための例示のプロセスの概略図を提供する。このプロセスは、標的変異誘発のためのプライム編集の態様と称されることもある。伸長されたガイドRNAは、ガイドRNAの3'末もしくは5'末での、またはガイドRNA中の分子内のある場所での伸長を含む。ステップ(a)において、napDNAbp/gRNA複合体はDNA分子に接触し、gRNAがnapDNAbpを、変異誘発されるべき標的遺伝子座へ結合するようにガイドする。ステップ(b)において、標的遺伝子座のDNAの鎖の一方にニックが導入され(例として、ヌクレアーゼまたは化学剤によって)、これによって標的遺伝子座の鎖の一方に利用可能な3'末が創出される。ある態様において、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配列とはハイブリダイズされない鎖中に創出される。ステップ(c)において、3'末DNA鎖は、逆転写をプライムするために、ガイドRNAの伸長部分と相互作用する。ある態様において、3'末のDNA鎖は、ガイドRNAの伸長部分上の特定のRTプライム配列とハイブリダイズする。ステップ(d)において、エラーを起こしやすい逆転写酵素が導入されるが、これは変異誘発されたDNAの単鎖を、プライムされた部位の3'末からガイドRNAの3'末へ合成する。例示の突然変異は星印「*」で示される。これは、所望の変異誘発領域を含む単鎖DNAフラップを形成する。ステップ(e)において、napDNAbpおよびガイドRNAは放出される。ステップ(f)および(g)は、所望の変異誘発領域が標的遺伝子座中へ組み込まれるように、単鎖DNAフラップ(変異誘発領域を含む)の分解に関する。このプロセスは、一旦3'単鎖DNAフラップが侵入して他の鎖上の相補的な配列とハイブリダイズすると、形成された対応の5'内生DNAフラップを除去することによって、所望の産物形成へ推進され得る。プロセスはまた、図1Fに例示されるとおり、第2鎖にニックが入れられた産物の形成へも推進され得る。内生DNA修復および/または複製プロセスに続き、変異誘発領域は、DNA遺伝子座のDNAの両鎖中へ組み込まれるようになる。

【０１３０】

【図２３】図23は、トリヌクレオチド反復(repeat)配列を縮小するためのgRNAデザインおよびTPRTゲノム編集(すなわち、プライム編集)でのトリヌクレオチド反復の縮小の概略図である。トリヌクレオチド反復拡大は、ハンチントン病、脆弱X症候群、およびフリートライヒ運動失調症を包含する、数多のヒト疾患に関連する。最も一般的なトリヌクレオチド反復はCAGトリプレットを含有するが、GAAトリプレット(フリートライヒ運動失調症)およびCGGトリプレット(脆弱X症候群)もまた生じる。拡大する素因を遺伝するか、または既に拡大された親のアレルを獲得すること(acquiring)は、疾患に罹る(acquiring)可能性を増大させる。トリヌクレオチド反復の病原性の拡大は仮説上、プライム

編集を使用して修正され得る。反復領域上流の領域は、RNAにガイドされる(-guided)ヌクレアーゼによってニックが入れられ、次いで、健常な数の反復(これは具体的な遺伝子および疾患に依存する)を含有する新しいDNA鎖の合成をプライムするのに使用され得る。反復配列の後に、反復の他端に隣接する配列の同一性にマッチする、一続きの短い相同(short stretch of homology)が加えられる(赤色鎖)。新しく合成された鎖の侵入、これに続く内生DNAの、新しく合成されたフラップとの置き換えが、縮小された反復アレルへ繋がる。

【０１３１】

【図２４】図24は、プライム編集での正確な10ヌクレオチド欠失を示す概略図である。HEK3遺伝子座が標的にするガイドRNAを、ニック部位の後に10ヌクレオチド欠失をコードする逆転写鋳型でデザインした。トランスフェクトされたHEK細胞における編集効率を、アンプリコン配列決定を使用して査定した。

【０１３２】

【図２５】図25は、内生ゲノム遺伝子座にて遺伝子をペプチドタグ付けする(peptide tagging)ためのgRNAデザインおよびTPRTゲノム編集(すなわち、プライム編集)でのペプチドタグ付けを示す概略図である。FlAsHおよびReAsHのタグ付け系は、2つの部分:(1)フルオロフォア-ニヒ素(biarsenical)プローブ、および(2)テトラシステインモチーフを含有する、遺伝子学的にコードされたペプチドを含み、配列FLNCCPGCCMEP(配列番号1)によって例示される。細胞内で発現されたとき、テトラシステインモチーフ含有タンパク質は、フルオロフォア-ヒ素プローブで蛍光標識され得る(参考文献:J.Am.Chem.Soc.,2002,124(21),pp6063-6076を参照。DOI:10.1021/ja017687n)。「ソルタグ付け(sortagging)」系は、標識ペプチドプローブを、好適なペプチド基質を含有するタンパク質へ共有結合的に抱合させる細菌ソルターゼ酵素を採用する(参考文献:Nat.Chem.Biol.2007 Nov;3(11):707-8を参照。DOI:10.1038/nchembio.2007.31)。FLAGタグ(DYKDDDDK(配列番号2))、V5タグ(GKPIPNPLLGLDST(配列番号3))、GCN4タグ(EELLSKNYHLENEVARLKK(配列番号4))、HAタグ(YPYDVPDYA(配列番号5))、およびMycタグ(EQKLISEEDL(配列番号6))は一般的に、免疫アッセイのためのエピトープタグとして採用される。パイクランプ(pi-clamp)は、ペンタフルオロ-芳香族基質で標識され得るペプチド配列(FCPF(配列番号622))をコードする(参考文献:Nat.Chem.2016 Feb;8(2):120-8。doi:10.1038/nchem.2413)。

【０１３３】

【図２６Ａ】図26Aは、ゲノムDNA中へのHis6タグおよびFLAGタグの正確な組み入れを示す。HEK3遺伝子座を標的にするガイドRNAを、18nt Hisタグ挿入または24nt FLAGタグ挿入のいずれかをコードする逆転写鋳型でデザインした。トランスフェクトされたHEK細胞における編集効率を、アンプリコン配列決定を使用して査定した。FLAGタグの全長24nt配列はフレームから見切れている点に留意する(配列決定によって全長の正確な挿入が確認された)。

【図２６Ｂ】図26Bは、(a)タンパク質を可溶化または不溶化させること、(b)タンパク質の細胞内局在化を変化させるかまたはこれを追跡すること、(c)タンパク質の半減期を延長すること、(d)タンパク質精製を容易にさせること、および(e)タンパク質の検出を容易にさせることを包含する、タンパク質/ペプチドのタグ付けを伴う様々な用途をまとめる概略図を示す。

【０１３４】

【図２７】図27は、プリオン病を防止またはその進行を停止させる防護性変異をPRNPに組み入れることによるプライム編集の概観を示す。PEgRNA配列は左において配列番号810の残基番号1～20(すなわち、sgRNA骨格の5')、右において配列番号810の残基番号21～43(すなわち、sgRNA骨格の3')に対応する。

【０１３５】

【図２８Ａ】図28Aは、RNAモチーフをコードする配列のPEに基づく挿入の模式図である。

【図２８Ｂ】図28Bは、潜在的に挿入され得るいくつかの例のモチーフの列挙(網羅的ではない)、およびそれらの機能である。
【０１３６】
【図２９】図29Aはプライム編集因子の図示である。図29BはPEによって導かれるゲノム、プラスミド、またはウイルスDNAへの可能な改変を示す。図29Cは、PEgRNAのライブラリによる規定されたタンパク質(このケースではGFP)上へのペプチドループのライブラリの挿入のための例のスキームを示す。図29Dは、異なるPEgRNAを用いるタンパク質のコドンの可能なプログラム可能な欠失またはNもしくはC末端短縮の例を示す。欠失はフレームシフト変異の最小限の生成でもって生起することが予測されるであろう。
【０１３７】
【図３０】図30は、PACEなどの連続的進化系におけるコドンの反復的挿入のための可能なスキームを示す。
【０１３８】
【図３１】図31は操作されたgRNAの説明である。gRNAコア、標的遺伝子の配列にマッチする～20ntスペーサー、免疫原性のエピトープヌクレオチド配列を有する逆転写鋳型、および標的遺伝子の配列にマッチするプライマー結合部位を示す。
【０１３９】
【図３２】図32は、公知の免疫原性エピトープを内生または外生のゲノムDNA上に挿入するための手段としてプライム編集を用いることの模式図であり、対応するタンパク質の改変をもたらす。
【０１４０】
【図３３】図33は、プライマー結合配列挿入のためのPEgRNAデザインと、オフターゲット編集を決定するためのプライム編集を用いるゲノムDNA上へのプライマー結合挿入とを示す模式図である。この態様では、プライム編集が生細胞、組織、または動物モデル内において行われる。第1のステップとして、適当なPEgRNAがデザインされる。上側の模式図は、この側面に用いられ得る例示のPEgRNAを示す。PEgRNA上のスペーサー(「プロトスペーサー」と標識されている)はゲノム標的の鎖の1つに対して相補的である。PE:PEgRNA複合体(すなわちPE複合体)は一本鎖3'端フラップをニック部位に組み入れし、これは、コードされるプライマー結合配列と、カットされた部位のちょうど下流の領域に対して相補的である相同領域(PEgRNAの相同アームによってコードされる)とを含有する(赤色による)。フラップ侵入およびDNA修復/複製プロセスによって、合成された鎖はDNA上に組み込まれるようになり、それによってプライマー結合部位を組み入れる。このプロセスは、所望のゲノム標的においてのみならず、オフターゲットの様式でPEgRNAと相互作用し得る他のゲノム部位においてもまた生起し得る(すなわち、意図されるゲノム部位ではない他のゲノム部位に対するスペーサー領域の相補性を原因として、PEgRNAはPE複合体を他のオフターゲット部位へとガイドする)。それゆえに、プライマー結合配列は、所望のゲノム標的においてのみならず、ゲノム上の他所のオフターゲットゲノム部位において組み入れられ得る。意図されるゲノム標的部位およびオフターゲットゲノム部位両方のこれらのプライマー結合部位の挿入を検出するためには、ゲノムDNA(PE後)が単離、フラグメント化、およびアダプターヌクレオチドにライゲーションされ得る(赤色で示されている)。次に、アダプターおよび挿入されたプライマー結合配列にアニールするPCRオリゴヌクレオチドによって、PCRが実行されて、プライマー結合部位がPEによって挿入されたオンターゲットおよびオフターゲットゲノムDNA領域を増幅し得る。次いでハイスループット配列決定が行われ、配列がアラインメントされて、オンターゲット部位またはオフターゲット部位どちらかにおけるPEによって挿入されたプライマー結合配列の挿入点を同定し得る。
【０１４１】
【図３４】図34は、PEによる遺伝子の精密な挿入を示す模式図である。
【０１４２】
【図３５】図35Aは、天然のインスリンシグナル経路を示す模式図である。図35Bは、F

K1012によってコントロールされるFKBP12タグ付けされたインスリン受容体活性化を示す模式図である。

【０１４３】

【図３６】図36は、低分子モノマーを示す。参照:バンプFK506ミミック(2)107。

【０１４４】

【図３７】図37A～37Bは、低分子二量体を示す。参照:FK1012 495,96;FK1012 5108;FK1012 6107;AP1903 7107;シクロスポリンA二量体898;FK506-シクロスポリンA二量体(FkCsA)9100。

【０１４５】

【図３８】図38A～38Fは、プライム編集、ならびにin vitroおよび酵母細胞における実現可能性研究の概観を提供する。図38Aは、ClinVar(2019年7月アクセス)の75,122の公知の病原性のヒト遺伝子バリアントを示し、型によって分類されている。図38Bは、プライム編集複合体が、操作された逆転写酵素ドメインに融合されたRNAによってガイドされるDNAニッキングドメイン、例えばCas9ニッカーゼを含有するかつプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)と複合体化したプライム編集因子(PE)タンパク質からなるということを示す。PE:PEgRNA複合体は標的DNA部位に結合し、標的部位のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の前および後の広い範囲のDNA位置における大きい種々の精密なDNA編集を可能化する。図38Cは、DNA標的結合によって、PE:PEgRNA複合体がPAM含有DNA鎖へニックを入れるということを示す。もたらされる遊離の3'端はPEgRNAのプライマー結合部位にハイブリダイズする。逆転写酵素ドメインはPEgRNAのRT鋳型を用いるプライマー伸長を触媒し、所望の編集を含有する新たに合成されたDNA鎖(3'フラップ)をもたらす。編集された3'フラップと元のDNAを含有する編集されない5'フラップとの間の平衡化、次に細胞性の5'フラップ切断およびライゲーション、ならびにヘテロ二重鎖DNAを分解するためのDNA修復または複製が、安定に編集されたDNAをもたらす。図38Dは、5'Cy5標識されたPAM鎖を含有する予めニックが入ったdsDNA基質、dCas9、および市販のM-MLV RTバリアント(RT、Superscript III)による、in vitroの5'伸長されたPEgRNAプライマー伸長アッセイを示す。dCas9が様々な長さのRT鋳型を含有するPEgRNAと複合体化させられ、次いで、指示されている構成要素と併せてDNA基質に追加された。反応は37℃で1時間に渡ってインキュベートされ、次いで変性尿素PAGEによって分析され、Cy5蛍光について視覚化された。図38Eは、dCas9またはCas9 H840Aニッカーゼと予め複合体化した3'伸長されたPEgRNAおよび予めニックが入ったまたはニッキングされていない5'Cy5標識dsDNA基質を用いて、図38Dのとおり行われたプライマー伸長を示す。図38Fは、PEgRNA、Cas9ニッカーゼ、およびRTによってin vitroで編集されたGFP-mCherry融合レポータープラスミドによって形質転換された酵母コロニーを示す。GFPおよびmCherryの間にナンセンスまたはフレームシフト変異を含有するプラスミドが、トランスバージョン変異、1bp挿入、または1bp欠失によってmCherry翻訳を復元する5'伸長または3'伸長されたPEgRNAによって編集された。GFPおよびmCherry二重陽性の細胞は(黄色)首尾良い編集を反映する。

【０１４６】

【図３９】図39A～39DはPE1およびPE2によるヒト細胞のゲノムDNAのプライム編集を示す。図39Aは、PEgRNAが、スペーサー配列、sgRNA骨格、ならびにプライマー結合部位(緑色)および編集される塩基(単数または複数)(赤色)を含有する逆転写(RT)鋳型(紫色)を含有する3'伸長を含有するということを示す。プライマー結合部位はニッキングの部位の直ちに上流のPAM含有DNA鎖にハイブリダイズする。コードされる編集を例外として、RT鋳型はニックの下流のDNA配列に対して相同的である。図39Bは、野生型M-MLV逆転写酵素に融合されたCas9 H840Aニッカーゼ(PE1)と様々なプライマー結合部位長さのPEgRNAとを用いるHEK293T細胞のHEK3部位におけるT・A→A・Tのトランスバージョン編集の組み入れを示す。図39Cは、PE2への操作された五重変異体M-MLV逆転写酵素(D200N,L603W,T306K,W313F,T330P)の使用が、HEK293T細胞の5つのゲノム部位におけるプライム編集トランスバージョン効率とHEK3における小さい

挿入および小さい欠失編集とを実質的に改善するということを示す。図39Dは、HEK293T細胞の5つのゲノム部位における様々なRT鋳型長さによるPE2編集効率の比較である。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１４７】

【図４０】図40A～40Cは、PE3およびPE3bシステムが非編集鎖へニックを入れてプライム編集効率を増大させるということを示す。図40AはPE3によるプライム編集の概観である。編集された鎖の当初の合成後に、DNA修復が、編集を含有する新たに合成された鎖(3'フラップ切除)または元のゲノムDNA鎖(5'フラップ切除)どちらかを除去するであろう。5'フラップ切除は、1つの編集された鎖および1つの非編集鎖を含有するDNAヘテロ二重鎖を後に残す。ミスマッチ修復機構またはDNA複製がヘテロ二重鎖を分解して、編集されたまたは非編集の産物どちらかを与え得る。非編集鎖へニックを入れることは、その鎖の修復を好み、所望の編集を含有する安定な二重鎖DNAの選好的生成をもたらす。図40Bは、PE3によって媒介されるプライム編集効率およびインデル形成に対する相補鎖ニッキングの効果を示す。「なし」は相補鎖にニッキングしないPE2対照を言う。図40Cは、PE2(相補鎖ニックなし)、PE3(一般的な相補鎖ニック)、およびPE3b(編集特異的な相補鎖ニック)による編集効率の比較である。全ての編集収量は、ソーティングなしの全ての処置された細胞のうち、意図される編集を含有するかつインデルを含有しない配列決定総読取のパーセンテージを反映する。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１４８】

【図４１】図41A～41Kは、HEK293T細胞の7つの内生ヒトゲノム遺伝子座におけるPE3による標的化された挿入、欠失、および全ての12の型の点変異を示す。図41Aは、10nt RT鋳型を用いるHEK3部位の位置+1～+8(PEgRNAによって誘導されるニックの位置付けを位置+1および-1の間としてカウントする)の全ての12の型の1ヌクレオチドトランジションおよびトランスバージョン編集を示すグラフである。図41Bは、34nt RT鋳型を用いるHEK3部位におけるロングレンジPE3トランスバージョン編集を示すグラフである。図41C-41Hは、プライム編集窓上の種々の位置における全ての12の型のトランジションおよびトランスバージョン編集を、(図41C)RNF2、(図41D)FANCF、(図41E)EMX1、(図41F)RUNX1、(図41G)VEGFA、および(図41H)DNMT1について示すグラフである。図41Iは、7つの内生ゲノム遺伝子座におけるPE3による標的化された1および3bp挿入ならびに1および3bp欠失を示すグラフである。図41Jは、HEK3標的部位における5～80bpの標的化された精密な欠失を示すグラフである。図41Kは、挿入および欠失、挿入および点変異、欠失および点変異、ならびに二重点変異の組み合わせ編集を、3つの内生ゲノム遺伝子座において示すグラフである。全ての編集収量は、ソーティングなしの全ての処置された細胞のうち、意図される編集を含有するかつインデルを含有しない配列決定総読取のパーセンテージを反映する。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１４９】

【図４２】図42A～42Hは、公知のCas9オフターゲット部位におけるCas9ならびにPE3によるプライム編集および塩基編集ならびにオフターゲット編集の比較を示す。図42Aは、HEK293T細胞の内生HEK3、FANCF、およびEMX1部位において、PE2、PE3、BE2max、およびBE4maxについて、同じ標的ヌクレオチドにおけるC・G→T・Aの総編集効率を示す。図42Bは図42Aの処置からのインデル度数を示す。図42Cは、精密なC・G→T・Aの編集(バイスタンダー編集またはインデルなし)の編集効率をPE2、PE3、BE2max、およびBE4maxについてHEK3、FANCF、およびEMX1において示す。EMX1では、3つの標的ヌクレオチドにおけるC・G→T・Aの変換の全ての可能な組み合わせの精密なPE組み合わせ編集もまた示されている。図42Dは、A・T→G・C総編集効率をPE2、PE3、ABEdmax、およびABEmaxについてHEK3およびFANCFにおいて示す。図42Eは、バイスタンダー編集またはインデルなしの精密なA・T→G・C編集効率をHEK3

およびFANCFについて示す。図42Fは図42Dの処置からのインデル度数を示す。図42Gは、HEK293T細胞における平均トリプリケート編集効率(インデルを有するパーセンテージ配列決定読取)を、Cas9ヌクレアーゼについて、4つのオンターゲットおよび16の公知のオフターゲット部位において示す。検分された16のオフターゲット部位は、4つのオンターゲット部位の夫々について上位4つの先に報告されたオフターゲット部位118,159であった。各オンターゲット部位について、Cas9はsgRNAとまたは同じプロトスペーサーを認識する4つのPEgRNAの夫々とペアリングされた。図42Hは、平均トリプリケートオンターゲットおよびオフターゲット編集効率ならびにインデル効率(下の括弧内)を、HEK293T細胞において、(図42G)の各PEgRNAとペアリングされたPE2またはPE3について示す。オンターゲット編集収量は、ソーティングなしの全ての処置された細胞のうち、意図される編集を含有するかつインデルを含有しない配列決定総読取のパーセンテージを反映する。オフターゲット編集収量はプライム編集と整合するオフターゲット遺伝子座改変を反映する。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５０】

【図４３】図43A～43Iは、種々のヒト細胞株および初代マウス皮質ニューロンにおけるプライム編集、病原性のトランスバージョン、挿入、または欠失変異の組み入れおよび修正、ならびにプライム編集およびHDRの比較を示す。図43Aは、HEK293T細胞のHBBにおける病原性のE6V変異の組み入れ(T・A→A・Tのトランスバージョンによる)および修正(A・T→T・Aのトランスバージョンによる)を示すグラフである。野生型HBBへのまたはPEgRNA PAMを遮断するサイレントな変異を含有するHBBどちらかへの修正が示されている。図43Bは、HEK293T細胞における病原性のHEXA 1278+TATCアレルの組み入れ(4bp挿入による)および修正(4bp欠失による)を示すグラフである。野生型HEXAまたはPEgRNA PAMを遮断するサイレントな変異を含有するHEXAどちらかへの修正が示されている。図43Cは、G・C→T・Aのトランスバージョンによる HEK293T細胞におけるPRNPの防護性のG127Vバリアントの組み入れを示すグラフである。図43Dは、K562(白血病骨髄細胞)、U2OS(骨肉腫細胞)、およびHeLa(子宮頸がん細胞)を包含する他のヒト細胞株におけるプライム編集を示すグラフである。図43Eは、マウス初代皮質ニューロンのDNMT1におけるG・C→T・Aのトランスバージョン変異の組み入れを示すグラフであり、二元的な分裂インテインPE3レンチウイルスシステムを用いている。これにおいては、N末端の半分は、Nインテインにかつ P2A自己切断ペプチドを介してGFP-KASHに融合されたCas9(1-573)であり、C末端の半分は、PE2の残りに融合されたCインテインである。PE2の半分同士は、成熟ニューロンに高度に特異的であるヒトシナプシンプロモーターから発現される。ソーティングされた値はGFP陽性の核からの編集またはインデルを反映し、未ソーティングの値は全ての核からである。図43Fは、HEK293T細胞の内生ゲノム遺伝子座におけるPE3およびCas9によって媒介されるHDR編集効率の比較である。図43Gは、K562、U2OS、およびHeLa細胞の内生ゲノム遺伝子座におけるPE3およびCas9によって媒介されるHDR編集効率の比較である。図43Hは、HEK293T、K562、U2OS、およびHeLa細胞におけるPE3およびCas9によって媒介されるHDRインデル副産物生成の比較である。図43Iは、PE3によるHEK293T細胞におけるHis6タグ(18bp)、FLAGエピトープタグ(24bp)、または伸長されたLoxP部位(44bp)の標的化された挿入を示す。全ての編集収量は、全ての処置された細胞のうち、意図される編集を含有するかつインデルを含有しない配列決定総読取のパーセンテージを反映する。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５１】

【図４４】図44A～44Gは、蛍光標識されたDNA基質によるin vitroのプライム編集検証研究を示す。図44Aは、dCas9、5'伸長されたPEgRNA、および5'-Cy5標識DNA基質による電気泳動移動度シフトアッセイを示す。PEgRNA 1～5は、スペーサーおよびPBSの間の15ntリンカー配列(PEgRNA 1ではリンカーA、PEgRNA 2～5ではリンカーB

)、5nt PBS配列、ならびに7nt(PEgRNA 1および2)、8nt(PEgRNA 3)、15nt(PEgRNA 4)、および22nt(PEgRNA 5)のRT鋳型を含有する。PEgRNAは、図44Eおよび44Fに用いられるものである;完全な配列は表2A～2Cに列記される。図44Bは、5'伸長されたおよび3'伸長されたPEgRNAを用いるCas9 H840Aのin vitroニッキングアッセイを示す。図44Cは、5'伸長されたおよび3'伸長されたPEgRNAを用いるHEK3におけるHEK293T細胞のCas9によって媒介されるインデル形成を示す。図44Dはプライム編集in vitro生化学アッセイの概観を示す。5'-Cy5標識された予めニックが入ったおよびニッキングされていないdsDNA基質が試験された。sgRNA、5'伸長されたPEgRNA、または3'伸長されたPEgRNAがdCas9またはCas9 H840Aニッカーゼと予め複合体化され、次いで、dsDNA基質、M-MLV RT、およびdNTPと組み合わせられた。変性尿素PAGEによる分離およびCy5蛍光による視覚化に先行して、反応が37℃で1時間に渡って進むことを許された。図44Eは、5'伸長されたPEgRNA、予めニックが入ったDNA基質、およびdCas9を用いるプライマー伸長反応が、RT産物への有意な変換に至るということを示す。図44Fは、ニッキングされていないDNA基質およびCas9 H840Aニッカーゼと図44Bのとおり5'伸長されたPEgRNAを用いるプライマー伸長反応を示す。産物収量は予めニックが入った基質と比較して多大に縮減される。図44Gは、3'-PEgRNAを用いるin vitroプライマー伸長反応が単一の明らかな産物を生成するということを変性尿素PAGEによって示す。RT産物バンドが切り出され、ゲルから溶出され、次いで、dGTPまたはdATPどちらかを用いるターミナルトランスフェラーゼ(TdT)によるホモポリマーテーリングに付された。テーリングされた産物はポリTまたはポリCプライマーによって伸長され、もたらされたDNAが配列決定された。Sangerトレースは、gRNA骨格に由来する3ヌクレオチドが逆転写された(最後の3'ヌクレオチドとしてDNA産物に追加された)ということを指示する。哺乳類細胞プライム編集実験では、PEgRNA骨格挿入はin vitroよりもかなり稀であるということに注意せよ(図56A～56D)。可能性としては、テザリングされた逆転写酵素がCas9に結合したガイドRNA骨格にアクセスすることの不能、および/またはPEgRNA骨格配列を含有する3'フラップのミスマッチの3'端の細胞性の切除を原因とする。

【０１５２】

【図４５】図45A～45Gはin vitroプライム編集反応からの3'DNAフラップの酵母における細胞性修復を示す。図45Aは、二元的蛍光タンパク質レポータープラスミドが、インフレームの停止コドン、+1フレームシフト、または-1フレームシフトをコードする標的部位によって分離されたGFPおよびmCherryオープンリーディングフレームを含有するということを示す。プライム編集反応がCas9 H840Aニッカーゼ、PEgRNA、dNTP、およびM-MLV逆転写酵素によってin vitroで実行され、次いで酵母に形質転換された。編集されないプラスミドを含有するコロニーはGFPを生ずるが、mCherryを生じない。編集されたプラスミドを含有する酵母コロニーはGFPおよびmCherry両方を融合タンパク質として生ずる。図45Bは、停止コドンをGFPおよびmCherryの間に含有する(編集されない負の対照。上側)または停止コドンもしくはフレームシフトをGFPおよびmCherryの間に含有しない(予め編集された正の対照。下側)レポータープラスミドによって形質転換された酵母コロニーのGFPおよびmCherry蛍光の重ね合わせを示す。図45C-45Fは、in vitroプライム編集反応産物によって形質転換された酵母コロニーからのmCherryおよびGFP蛍光の視覚化を示す。図45Cは、図45Dに示されているとおり、3'伸長されたPEgRNAまたは5'伸長されたPEgRNAを用いるT・A→A・Tのトランスバージョンによる停止コドン修正を示す。図45Eは、3'伸長されたPEgRNAを用いる1bp欠失の+1フレームシフト修正を示す。図45Fは、3'伸長されたPEgRNAを用いる1bp挿入による-1フレームシフト修正を示す。図45Gは、図45BのGFPのみコロニーならびに図45CのGFPおよびmCherry二重陽性コロニーから単離されたプラスミドからのSanger DNA配列決定トレースを示す。

【０１５３】

【図４６】図46A～46FはPE1による正しい編集対インデル生成を示す。図46AはHEK

3の+1位置におけるPE1によるT・A→A・Tのトランスバージョン編集効率およびインデル生成を示し、10nt RT鋳型と8-17ntの範囲であるPBS配列とを含有するPEgRNAを用いる。図46Bは、EMX1の+5位置におけるPE1によるG・C→T・Aのトランスバージョン編集効率およびインデル生成を示し、13nt RT鋳型と9-17ntの範囲であるPBS配列とを含有するPEgRNAを用いる。図46Cは、FANCFの+5位置におけるPE1によるG・C→T・Aのトランスバージョン編集効率およびインデル生成を示し、17nt RT鋳型と8-17ntの範囲であるPBS配列とを含有するPEgRNAを用いる。図46Dは、RNF2の+1位置におけるPE1によるC・G→A・Tのトランスバージョン編集効率およびインデル生成を示し、11nt RT鋳型と9-17ntの範囲であるPBS配列とを含有するPEgRNAを用いる。図46EはHEK4の+2位置におけるPE1によるG・C→T・Aのトランスバージョン編集効率およびインデル生成を示し、13nt RT鋳型と7-15ntの範囲であるPBS配列とを含有するPEgRNAを用いる。図46FはHEK3部位におけるPE1によって媒介される+1T欠失、+1A挿入、および+1CTT挿入を示し、13nt PBSおよび10nt RT鋳型を用いる。PEgRNAの配列は図39Cに用いられるものである(表3A-3Rを見よ)。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５４】

【図４７】図47A～47Sはプライム編集のためのM-MLV RTバリアントの評価を示す。図47Aは、この図に用いられるプライム編集因子バリアントの略語を示す。図47BはHEK3遺伝子座におけるPE1による標的化された挿入および欠失編集を示す。図47C～47Hは、図47Cに示されているとおりHEK3における+2G・C→C・Gのトランスバージョン編集、図47Dに示されているとおりHEK3における24bp FLAG挿入、図47Eに示されているとおりRNF2における+1C・G→A・Tのトランスバージョン編集、図47Fに示されているとおりEMX1における+1G・C→C・Gのトランスバージョン編集、図47Gに示されているとおりHBBにおける+2T・A→A・Tのトランスバージョン編集、および図47Hに示されているとおりFANCFにおける+1G・C→C・Gのトランスバージョン編集を組み入れるそれらの能力について、M-MLV RTバリアントを含有する18のプライム編集因子構築物の比較を示す。図47I～47Nは、独立した実験の第2ラウンドにおいて図47C-47Hに示されている編集を組み入れるそれらの能力について、M-MLVバリアントを含有する4つのプライム編集因子構築物の比較を示す。図47O～47Sは、様々なPBS長さによる5つのゲノム遺伝子座におけるPE2編集効率を示す。図47OはHEK3における+1T・A→A・Tのバリエーションを示す。図47PはEMX1における+5G・C→T・Aのバリエーションを示す。図47QはFANCFにおける+5G・C→T・Aのバリエーションを示す。図47RはRNF2における+1C・G→A・Tのバリエーションを示す。図47SはHEK4における+2G・C→T・Aバリエーションを示す。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５５】

【図４８】図48A～48CはPEgRNA PBSおよびRT鋳型配列のデザイン特色を示す。図48Aは、RT鋳型長さの関数としてHEK293T細胞のVEGFAにおけるPE2によって媒介される+5G・C→T・Aのトランスバージョン編集効率(青色線)を示す。インデル(灰色線)が比較のためにプロットされている。グラフの下の配列は、PEgRNAによる合成のための鋳型とする編集のための最後のヌクレオチドを示す。Gヌクレオチド(PEgRNA上のCを鋳型とする)が強調されている;プライム編集効率を最大化するために、Cで終わるRT鋳型はPEgRNAのデザインの間に回避されるべきである。図48Bは、図48AのとおりDNMT1の+5G・C→T・Aのトランスバージョン編集およびインデルを示す。図48Cは、図48AのとおりRUNX1の+5G・C→T・Aのトランスバージョン編集およびインデルを示す。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５６】

【図４９】図49A～49Bは、細胞生存性に対するPE2、PE2 R110S K103L、Cas9 H840Aニッカーゼ、およびdCas9の効果を示す。HEK293T細胞が、HEK3標的化PEgR

NAプラスミドと一緒にPE2、PE2 R110S K103L、Cas9 H840Aニッカーゼ、またはdCas9をコードするプラスミドによってトランスフェクションされた。細胞生存性が、24時間毎に、トランスフェクション後に3日に渡ってCellTiter-Glo2.0アッセイ(Promega)を用いて測定された。図49Aは、トランスフェクション後の1、2、または3日にルミネセンスによって測定された生存性を示す。値およびエラーバーは、夫々が技術的トリプリケートで行われた3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.e.m.を反映する。図49Bは、+5G→Aの編集をコードするHEK3標的化PEgRNAプラスミドと一緒に、PE2、PE2 R110S K103L、Cas9 H840Aニッカーゼ、またはdCas9について、パーセントの編集およびインデルを示す。編集効率が、トランスフェクション後の第3日に、図49Aの生存性をアッセイするために用いられたものと並べて、処置された細胞から測定された。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５７】

【図５０】図50A～50Bは、種々のPEgRNAによるPE3によって媒介されるHBB E6V修正およびHEXA 1278+TATC修正を示す。図50Aは、PE3によるHEK293T細胞のHBB E6Vアレルの修正のための14のPEgRNAのスクリーンを示す。評価された全てのPEgRNAは、いずれかのサイレントなPAM変異の導入なしに、HBB E6Vアレルを再び野生型HBBに変換する。図50Bは、PE3またはPE3bによるHEK293T細胞のHEXA 1278+TATCアレルの修正のための41のPEgRNAのスクリーンを示す。HEXAと標識されたPEgRNAは、PAMを遮断しかつサイレントな変異を残すシフトした4bp欠失によって病原性のアレルを修正する。HEXAと標識されたPEgRNAは病原性のアレルを再び野生型へと修正する。「b」で終わるエントリーは編集特異的なニッキングsgRNAをPEgRNAとの組み合わせで用いる(PE3bシステム)。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５８】

【図５１】図51A～51Gは、ヒト細胞株におけるPE3活性とPE3およびCas9によって開始されるHDRの比較とを示す。図51Aに示されているとおりHEK293T細胞、図51Bに示されているとおりK562細胞、図51Cに示されているとおりU2OS細胞、および図51Dに示されているとおりHeLa細胞において、PE3およびCas9によって開始されるHDRについて、正しい編集(インデルなし)およびインデル度数を生成する効率。各ひとくくりされた編集の比較は、PE3およびCas9によって開始されるHDRによって同一の編集を組み入れる。非標的化対照はPE3および非標的遺伝子座を標的化するPEgRNAである。図51Eは、野生型Cas9 HDR実験と比較した非標的化PEgRNA+PE3およびdCas9+sgRNAによる対照実験を示す。見かけ上のHDR効率を偽性的に上昇させる普通のコンタミナントのssDNAドナーHDR鋳型が図51A～51DのHDR測定に寄与しないということを確認している。図51F～51Gは、PE3またはCas9によって開始されるHDRによる編集後にK562細胞から単離されたゲノムDNAサンプルからの例のHEK3部位アレル表を示す。アレルがIllumina MiSeqによって配列決定され、CRISPResso2によって分析された178。この領域からの参照HEK3配列は上側にある。アレル表が、非標的化PEgRNAの負の対照、PE3を用いるHEK3における+1CTT挿入、およびCas9によって開始されるHDRを用いるHEK3における+1CTT挿入について示されている。アレル度数および対応するIllumina配列決定読取カウントが各アレルについて示されている。度数≧0.20％で観察された全てのアレルが示されている。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１５９】

【図５２】図52A～52Dは、ClinVarデータベース上の病原性の挿入、重複、欠失、およびインデルの長さの分布を示す。ClinVarバリアントサマリーが2019年7月15日にNCBIからダウンロードされた。報告された挿入、欠失、および重複の長さが、参照および代替対立遺伝子、バリアントスタートおよびストップ位置、またはバリアント名称の適当な識別情報を用いて計算された。上の情報のいずれかを報告しなかったバリアントは分析

から排除された。報告されたインデル(参照ゲノムに対して相対的に挿入および欠失両方を包含する単一のバリアント)の長さは、参照および代替対立遺伝子の間の最も良好なペアワイズアラインメントにおけるミスマッチまたはギャップの数を決定することによって計算された。

【０１６０】

【図５３】図53A～53Eは、GFP陽性の細胞ソーティングについてFACSゲーティング例を示す。下は元のバッチ分析ファイルの例であり、HEXA 1278+TATCおよびHBB E6V HEK293T細胞株を生成するために用いられたソーティング戦略を概説する。イメージデータはCell Sorterソフトウェアv.3.0.5を用いてSony LE-MA900サイトメーターによって生成された。グラフィック1は、GFPを発現しない細胞のゲーティングプロットを示す。グラフィック2は、HBB E6V HEK293T細胞株を単離するために用いられたP2A-GFP発現細胞の例のソーティングを示す。HEK293T細胞は、当初にはFSC-A/BSC-A(ゲートA)を用いて集団でゲーティングされ、次いでFSC-A/FSC-H(ゲートB)を用いてシングレットについてソーティングされた。生細胞はDAPI陰性細胞(ゲートC)をゲーティングすることによってソーティングされた。負の対照の細胞のものよりも上であるGFP蛍光レベルを有する細胞は、フルオロクロームとしてEGFPを用いてソーティングされた(ゲートD)。図53AはHEK293T細胞(GFP陰性)を示す。図53Bは、PE2-P2A-GFPを発現する細胞についてのFACSゲーティングの代表的なプロットを示す。図53Cは、HEXA 1278+TATCホモ接合体HEK293T細胞の遺伝子型を示す。図53D～53EはHBB E6Vホモ接合体HEK293T細胞株のアレル表を示す。

【０１６１】

【図５４】図54はPEgRNAクローニング手続きをまとめる模式図である。

【０１６２】

【図５５】図55A～55GはPEgRNAデザインの模式図である。図55Aは、ドメインが標識された(左)およびゲノム部位においてnCas9に結合された(右)PEgRNAの単純なダイアグラムを示す。図55Bは、活性を増大させることが予期されるPEgRNAの種々の型の修飾を示す。図55Cは、プロモーター選択肢ならびに5'、3'プロセシングおよび終結によってより長いRNAの転写を増大させるためのPEgRNAの修飾を示す。図55DはP1システムの長大化を示す。これは骨格修飾の例である。図55Eは、鋳型領域上におけるまたはPEgRNA上の他所における合成的修飾の組み込みが活性を増大させ得るということを示す。図55Fは、鋳型上の最小限の二次構造のデザインされた組み込みが、より長いより阻害性の二次構造の形成を防止し得るということを示す。図55Gは、PEgRNAの3'端においてRNAエレメントによってアンカー固定された第2の鋳型配列を有する分裂PEgRNAを示す(左)。PEgRNAの5'または3'端におけるエレメントの組み込みはRT結合を増強し得る。

【０１６３】

【図５６】図56A～56Dは標的遺伝子座へのPEgRNA骨格配列の組み込みを示す。HTSデータが図60A～60Bに記載されているとおりPEgRNA骨格配列挿入について分析された。図56AはEMX1遺伝子座の分析を示す。RT鋳型に隣接する挿入上に1以上のPEgRNA骨格配列ヌクレオチドを含有する配列決定総読取の%(左);規定された長さのPEgRNA骨格配列挿入を含有する配列決定総読取のパーセンテージ(中央);および最高でX軸上に規定された長さを包含するPEgRNA挿入の累積の総パーセンテージが示されている。図56Bは図56Aと同じことをFANCFについて示す。図56Cは図56Aと同じことをHEK3について示す。図56Dは図56Aと同じことをRNF2について示す。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０１６４】

【図５７】図57A～57Iは、トランスクリプトームワイドなRNA存在量に対するPE2、PE2-dRT、およびCas9 H840Aニッカーゼの効果を示す。PE2、PE2-dRT、またはCas9 H840AニッカーゼとPRNP標的化またはHEXA標的化PEgRNAとを発現するHEK293T細胞から単離された、リボソームRNAを枯渇させられた細胞RNAの分析。14,410遺伝

子および14,368遺伝子に対応するRNAが夫々PRNPおよびHEXAサンプルにおいて検出された。図57A～57Fは、-log10 FDR調整されたp値対log2転写物存在量の～倍の変化を各(Aeach)RNAについて呈示するボルケーノプロットを示す。(図57A)PRNP標的化PEgRNAによるPE2対PE2-dRT、(図57B)PRNP標的化PEgRNAによるPE2対Cas9 H840A、(図57C)PRNP標的化PEgRNAによるPE2-dRT対Cas9 H840A、(図57D)HEXA標的化PEgRNAによるPE2対PE2-dRT、(図57E)HEXA標的化PEgRNAによるPE2対Cas9 H840A、(図57F)HEXA標的化PEgRNAによるPE2-dRT対Cas9 H840Aを比較している。赤色のドットは、統計的に有意である相対存在量の≧2倍の変化を示す遺伝子を指示する(FDR調整されたp＜0.05)。図57G-57Iは、上方制御および下方制御される転写物(≧2倍変化)のベン図であり、PRNPおよびHEXAサンプルを(図57G)PE2対PE2-dRT、(図57H)PE2対Cas9 H840A、および(図57I)PE2-dRT対Cas9 H840Aについて比較している。

【０１６５】

【図５８】図58A～58Bはニューロン核ソーティングのための代表的なFACSゲーティングを示す。核が、DyeCycle Rubyシグナル、FSC/SSC比、SSC幅/SSC高さ比、およびGFP/DyeCycle比に基づいて逐次的にゲーティングされた。

【０１６６】

【図５９】図59A～59Gは、3'伸長されたPEgRNAをゴールデンゲートアセンブリによって哺乳類U6発現ベクター上にクローニングするためのプロトコールを示す。図59Aはクローニングの概観を示す。図59Bは「ステップ1:pU6-PEgRNA-GG-ベクタープラスミドを消化(構成要素1)」を示す。図59Cは「ステップ2および3:オリゴヌクレオチドペアーツを順序付けおよびアニーリング(構成要素2、3、および4)」を示す。図59Dは「ステップ2.b.ii.:sgRNA骨格リン酸化(オリゴヌクレオチドがリン酸化されて購入された場合には不必要)」を示す。図59Eは「ステップ4:PEgRNAアセンブリ」を示す。図59Fは「ステップ5および6:アセンブリされたプラスミドの形質転換」を示す。図59GはPEgRNAクローニングプロトコールをまとめるダイアグラムを示す。

【０１６７】

【図６０】図60A～60Bは、PEgRNA骨格取り入れを定量するためのPythonスクリプトを示す。標的ゲノム遺伝子座におけるPEgRNA挿入を特徴付けおよび定量するために、カスタムのpythonスクリプトが生成された。スクリプトは、参照配列(ガイドRNA骨格配列)から取られた増大していく長さのテキストストリングをfastqファイル内の配列決定読取と反復的にマッチさせ、検索クエリにマッチする配列決定読取の数をカウントする。各順次のテキストストリングは、ガイドRNA骨格配列の追加のヌクレオチドに対応する。厳密な長さ取り入れおよび最高で規定された長さの累積の取り入れが、この様式で計算された。sgRNAの短いスライスのアラインメントおよび正確なカウントを保証するために、参照配列のスタートにおいては、逆転写酵素によって合成される新たなDNA鎖の3'端の5～6塩基が包含される。

【０１６８】

【図６１】図61は、SaCas9(N580A)-MMLV RT HEK3 +6C＞Aについて、規定された編集を有する配列決定総読取のパーセントを示すグラフである。正しい編集およびインデルの値が示されている。

【０１６９】

【図６２】図62A～62Bは、プライム編集による精密な位置付けにおける所望の編集の効率的な組み入れにとってのプロトスペーサーの重要性を示す。図62Aは、種々のHEK3遺伝子座について、標的T・A塩基対がA・Tに変換された配列決定総読取のパーセントを示すグラフである。図62Bはそれを示す配列分析である。

【０１７０】

【図６３】図63はPAM編集のSpCas9 PAMバリアントを示すグラフである(N=3)。標的化されたPAM編集を有する配列決定総読取のパーセントが、NGA＞NTAであるSpCas9(H840A)-VRQR-MMLV RTについて、およびNGCG＞NTCGであるSpCas9(H840A

)-VRER-MMLV RTについて示されている。用いられたPEgRNAプライマー結合部位(PBS)長さ、RT鋳型(RT)長さ、およびPEシステムが列記される。

【０１７１】

【図６４】図64A～64Fは、PEを用いるゲノム上への種々の部位特異的リコンビナーゼ(SSR)標的の導入を示す模式図である。図64Aは、プライム編集因子によるリコンビナーゼ標的配列の挿入の一般的な模式図を提供する。図64Bは、どのようにしてPEによって挿入される単一のSSR標的がDNAドナー鋳型のゲノム取り入れのための部位として用いられ得るかを示す。図64Cは、どのようにしてSSR標的部位のタンデム挿入がゲノムの部分を欠失させるために用いられ得るかを示す。図64Dは、どのようにしてSSR標的部位のタンデム挿入がゲノムの部分を逆位させるために用いられ得るかを示す。図64Eは、どのようにして2つの遠位の染色体領域における2つのSSR標的部位の挿入が染色体転座をもたらし得るかを示す。図64Fは、どのようにしてゲノム上の2つの異なるSSR標的部位の挿入がDNAドナー鋳型からのカセットを交換するために用いられ得るかを示す。

【０１７２】

【図６５】図65は、1)ヒト細胞ゲノム上のSSR標的部位のPEによって媒介される合成および2)GFP発現マーカーを含むDNAドナー鋳型を取り入れするためのそのSSR標的部位の使用を示す。ひとたび首尾良く取り入れられると、GFPは細胞が蛍光発光することを引き起こす。さらなる詳細は例17を見よ。

【０１７３】

【図６６】図66は、2つのPEの半分のタンパク質として提供されているプライム編集因子の1つの態様を図示する。これらは、プライム編集因子の半分のタンパク質の夫々の終わりまたは始まりに位置付けられた分裂インテインの半分同士の自己スプライシング作用によって、丸ごとのプライム編集因子を再生する。

【０１７４】

【図６７】図67A～67Bは、N末端およびC末端エクステイン配列の間におけるポリペプチド配列からのインテイン除去およびペプチド結合の再形成の機序を図示する。図67Aは、夫々がインテイン配列の半分を含有する2つの半分のタンパク質の一般的な機序を図示する。これらは、細胞内で接触するときに、完全に機能的なインテインをもたらす。これは、次いで、自己スプライシングおよび切除を経過する。切除のプロセスはN末端のタンパク質の半分(または「Nエクステイン」)およびC末端のタンパク質の半分(または「Cエクステイン」)の間におけるペプチド結合の形成をもたらして、NエクステインおよびCエクステイン部分を含む丸ごとの単一ポリペプチドを形成する。種々の態様において、Nエクステインは分裂されたプライム編集因子融合タンパク質のN末端の半分に対応し得、Cエクステインは分裂されたプライム編集因子のC末端の半分に対応し得る。(b)は、インテイン切除とNエクステインの半分(赤色をした半分)およびCエクステインの半分(青色をした半分)を連結するペプチド結合の再形成との化学的機序を示す。それにはトランスで提供される2つの別個の構成要素のスプライシング作用が関わるので、分裂インテイン(すなわち、分裂インテイン構成でのNインテインおよびCインテイン)の切除は「トランススプライシング」ともまた言われ得る。

【０１７５】

【図６８Ａ】図68Aは、HEK293T細胞にコトランスフェクションされるときに、リンカーにおけるSpPE(配列番号3875、3876)の分裂インテインの半分同士両方の送達が3つの試験遺伝子座において活性を維持するということを実証する。

【図６８Ｂ】図68Bは、HEK293T細胞にコトランスフェクションされるときに、SaPE2(例えば、配列番号443および配列番号450)の分裂インテインの半分同士両方の送達が全長SaPE2(配列番号134)の活性を再現するということを実証する。引用符で指示されている残基はSaCas

【０１７６】

SaCas9のアミノ酸741-743(C末端エクステインの最初の残基)の配列であり、これらはインテイントランススプライシング反応にとって重要である。「SMP」はネイティ

ブな残基である。我々はこれらを「CFN」コンセンサススプライシング配列へもまた変異させた。プライム編集パーセンテージによって測定されるとおり、コンセンサス配列は最も高い再構成を生むことが示されている。

【０１７７】

【図６８Ｃ】図68Cは、種々の開示されるPEリボヌクレオタンパク質複合体(高濃度のPE2、高濃度のPE3、および低濃度のPE3)がこの様式で送達され得るということを示すデータを提供する。

【０１７８】

【図６９】図69は、PANCEにおけるPE有効性を決定するためのバクテリオファージプラークアッセイを示す。プラーク(暗色の円)は首尾良くE.coliに感染する能力があるファージを指示する。L-ラムノースの濃度を増大させることは、PEの増大した発現およびプラーク形成の増大をもたらす。プラークの配列決定は、PEによって組み入れされるゲノム編集の存在を明らかにした。

【０１７９】

【図７０】図70A～70Iは、プライム編集のためのPEgRNAおよびニッキングsgRNAをデザインするためのステップバイステップの説明書の例解として、編集された標的配列の例を提供する。図70A:ステップ1．標的配列および編集を定める。所望の編集(点変異、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせ)の位置付けを中心にした標的DNA領域(～200bp)の配列をリトリーブする。図70B:ステップ2．標的PAMを位置付ける。編集位置付けに対して近位のPAMを同定する。両鎖上のPAMを探すように気をつける。編集位置に近接するPAMが好ましいが、編集位置から≧30ntにニックを置くプロトスペーサーおよびPAMを用いて編集を組み入れることが可能である。図70C:ステップ3．ニック部位を位置付ける。考慮されようとする各PAMについて、対応するニック部位を同定する。Sp Cas9 H840Aニッカーゼでは、切断はPAM含有鎖上においてNGG PAMの5'の第3および第4の塩基の間で生起する。全ての編集されるヌクレオチドはニック部位の3'に存在しなければならない。そのため、適当なPAMがPAM含有鎖上の標的編集の5'にニックを置かなければならない。下で示されている例では、2つの可能なPAMがある。単純のために、残りのステップはPAM 1のみを用いるPEgRNAのデザインを実証する。図70D:ステップ4．スペーサー配列をデザインする。Sp Cas9のプロトスペーサーは、PAM含有鎖上のNGG PAMの5'の20ヌクレオチドに対応する。効率的なPol III転写開始はGが第1の転写されるヌクレオチドであることを要求する。プロトスペーサーの第1のヌクレオチドがGである場合には、PEgRNAのスペーサー配列は単純にプロトスペーサー配列である。プロトスペーサーの第1のヌクレオチドがGではない場合には、PEgRNAのスペーサー配列は、G、次にプロトスペーサー配列である。図70E:ステップ5．プライマー結合部位(PBS)をデザインする。出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のDNAプライマーを同定する。DNAプライマーの3'端はニック部位のちょうど上流のヌクレオチドである(すなわち、Sp Cas9ではNGG PAMの5'の第4の塩基)。PE2およびPE3への使用のための一般的なデザイン原理としては、DNAプライマーに対する相補性の12～13ヌクレオチドを含有するPEgRNAプライマー結合部位(PBS)が、～40-60%のGC含量を含有する配列に用いられ得る。低いGC含量を有する配列では、より長い(14～15nt)PBSが試験されるべきである。より高いGC含量を有する配列では、より短い(8～11nt)PBSが試験されるべきである。GC含量にかかわらず、最適なPBS配列は経験的に決定されるはずである。長さpのPBS配列をデザインするためには、出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のニック部位の5'の最初のpヌクレオチドの逆相補体を取る。図70F:ステップ6．RT鋳型をデザインする。RT鋳型は、デザインされた編集と編集に隣接する配列に対する相同性とをコードする。最適なRT鋳型長さは標的部位に基づいて変わる。ショートレンジ編集(位置+1～+6)では、短い(9～12nt)、中程度の(13～16nt)、および長い(17～20nt)RT鋳型を試験することが推奨される。ロングレンジ編集(位置+7以降)では、十分な3'DNAフラップ相同性を許すために、編集の位置を越えて少なくとも5nt(好ましくは10nt以上)伸長するRT鋳型を用いることが推奨される。ロングレンジ編集では、機能的なデザイ

ンを同定するためには、いくつかのRT鋳型がスクリーニングされるべきである。より大きい挿入および欠失(≧5nt)では、RT鋳型上へのより多大な3'相同性(～20nt以上)の組み込みが推奨される。RT鋳型が、逆転写されるDNA産物上の最後のヌクレオチドとしてG(PEgRNAのRT鋳型ではCに対応する)の合成をコードするときには、編集効率は典型的には損なわれる。多くのRT鋳型が効率的なプライム編集を支持するので、RT鋳型をデザインするときには、最後の合成されるヌクレオチドとしてのGの回避が推奨される。長さrのRT鋳型配列をデザインするためには、所望のアレル配列を用い、元々はPAMを含有した鎖上のニック部位の3'の最初のrヌクレオチドの逆相補体を取る。SNP編集と比較して、同じ長さのRT鋳型を用いる挿入または欠失編集は同一の相同性を含有しないであろうということに注意。図70G:ステップ7．完全なPEgRNA配列をアセンブリする。PEgRNA構成要素を次の順序でコンカテネーションする(5'→3'):スペーサー、骨格、RT鋳型、およびPBS。図70H:ステップ8．PE3のためのニッキングsgRNAをデザインする。編集の上流および下流の非編集鎖上のPAMを同定する。最適なニッキング位置は高度に遺伝子座依存性であり、経験的に決定されるはずである。一般的に、PEgRNAによって誘導されるニックの向かいの位置の40～90ヌクレオチド5'に置かれたニックは、より高い編集収量およびより少数のインデルに至る。ニッキングsgRNAは、出発アレル上の20ntプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有する。プロトスペーサーがGで始まらない場合には5'Gの追加を有する。図70I:ステップ9．PE3bニッキングsgRNAをデザインする。PAMが相補鎖上に存在し、かつその対応するプロトスペーサーが編集のために標的化される配列とオーバーラップする場合には、この編集はPE3bシステムの候補であり得る。PE3bシステムでは、ニッキングsgRNAのスペーサー配列は出発アレルではなく所望の編集されるアレルの配列にマッチする。編集されるヌクレオチド(単数または複数)がニッキングsgRNAプロトスペーサーのシード領域(PAMに隣接する～10nt)内に収まるときには、PE3bシステムは効率的に作動する。これは、編集された鎖の組み入れ後まで相補鎖のニッキングを防止し、標的DNAに結合することについてのPEgRNAおよびsgRNAの間の競合を防止する。PE3bは、両鎖上の同時のニックの生成をもまた回避し、それゆえに、高い編集効率を維持しながらインデル形成を有意に縮減する。PE3b sgRNAは、所望のアレルの20ntプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有するはずである。必要とされる場合には5'Gの追加を有する。

【０１８０】

【図７１Ａ】図71AはSpCas9 PEgRNA分子(上側)のヌクレオチド配列を示す。これは3'端において「UUU」で終結し、トウループエレメントを含有しない。図の下方の部分は同じSpCas9 PEgRNA分子を図示するが、「UUU」3'端の直ちに前に挿入された配列5'-「GAAANNNNN」-3'を有するトウループエレメントを含有するようにさらに改変される。「N」はいずれかの核酸塩基であり得る。

【０１８１】

【図７１Ｂ】図71BはHEK細胞またはEMX細胞におけるプライム編集の効率がトウループエレメントを含有するPEgRNAを用いて増大させられるが、インデル形成のパーセントは大きくは変化なしであるということを実証する。

【０１８２】

【図７２】図72A～72Cはプライム編集に用いられ得る代替的なPEgRNA構成を図示する。図72Aはプライム編集のPE2:PEgRNA態様を図示する。この態様には、PEgRNAと複合体化したPE2(Cas9および逆転写酵素を含む融合タンパク質)が関わる(図1A～1Iおよび/または図3A～3Eにもまた記載されているとおり)。この態様では、逆転写の鋳型がsgRNAの3’伸長アーム上に組み込まれてPEgRNAを作り、DNAポリメラーゼ酵素はCas9に直接的に融合された逆転写酵素(RT)である。図72BはMS2cp-PE2:sgRNA+tPERT態様を図示する。この態様は、PE2融合体(Cas9+逆転写酵素)を含み、これがさらにMS2バクテリオファージコートタンパク質(MS2cp)に融合されてMS2cp-PE2融合タンパク質を形成する。プライム編集を達成するためには、MS2cp-PE2融合タンパク質はsgRNAと複合体化させられ、これは複合体をDNA上の特異的な標的部位へと標的化する。次

いで、態様には、トランスプライム編集RNA鋳型(「tPERT」)の導入が関わり、これは、プライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鋳型を別個の分子、すなわちtPERTによって提供することによって、PEgRNAの代わりに作動する。これはMS2アプタマー(ステムループ)をもまた備える。MS2cpタンパク質は分子のMS2アプタマーに結合することによってtPERTを動員する。図72Cは、核酸分子の化学合成のための公知の方法によって達成され得るPEgRNAの代替的なデザインを図示する。例えば、プライム編集への使用のためのハイブリッドRNA/DNA PEgRNA分子を合成するために、化学合成が用いられ得、ハイブリッドPEgRNAの伸長アームはRNAの代わりにDNAである。かかる態様では、プライム編集によって形成される所望の遺伝子変化を含む3'DNAフラップを合成するために、DNA依存性DNAポリメラーゼが逆転写酵素の代わりに用いられ得る。別の態様では、伸長アームは、化学的リンカーを包含するように合成され得、これは、DNAポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)がsgRNA骨格またはバックボーンを鋳型として用いることを防止する。なお別の態様では、伸長アームは、PEgRNA分子の総体的な向きに対して相対的に逆の向きを有するDNA合成鋳型を含み得る。例えば、sgRNA骨格の3'端に取り付けられた伸長を有するかつ5'→3'の向きのPEgRNAについて示されるとおりでは、DNA合成鋳型は、対向する方向、すなわち3'→5'の方向を向く。この態様は、gRNAの3’端に位置取った伸長アームを有するPEgRNA態様にとって有利であり得る。伸長アームの向きを逆にすることによって、ひとたびそれが伸長アームの新たな向きの5’に達すると、ポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)によるDNA合成は終結し、それゆえに、鋳型としてgRNAコアを用いるリスクがないであろう。

【０１８３】

【図７３】図73はtPERTおよびMS2動員システム(MS2タグ付け技術としてもまた公知)によるプライム編集を実証する。プライム編集因子タンパク質(PE2)を標的遺伝子座へと標的化するsgRNAが、プライマー結合部位(13ntまたは17nt PBS)、His6タグ挿入および相同アームをコードするRT鋳型、ならびにMS2アプタマー(tPERT分子の5'または3'端に位置付けられる)を含有するtPERTとの組み合わせで発現される。プライム編集因子タンパク質(PE2)、またはPE2のN末端へのMS2cpの融合体どちらかが用いられた。先に開発されたPE3システムのとおり、相補鎖ニッキングsgRNAありまたはなしで、編集が実行された(夫々標識「PE2+ニック」または「PE2」としてx軸上に指定されている)。これは「第2鎖ニッキング」ともまた言われ、本願において定められる。

【０１８４】

【図７４】図74は、トランスでの逆転写酵素のMS2アプタマー発現とMS2アプタマーシステムによるその動員とを実証する。PEgRNAのPEgRNAは2つのsgRNA骨格へアピンのどちらか1つに挿入されたMS2 RNAアプタマーを含有する。野生型M-MLV逆転写酵素はMS2コートタンパク質(MCP)へのN末端またはC末端融合体として発現される。編集はHEK293T細胞のHEK3部位においてである。

【０１８５】

【図７５】図75は、PE2、PE2-trunc、PE3、およびPE3-truncの効率(すなわち「規定された編集またはインデルを有する配列決定総読取の%」)を種々の細胞株の異なる標的部位について比較する棒グラフを提供する。データは、短縮されたRTバリアントを含むプライム編集因子が短縮されていないRTタンパク質を含むプライム編集因子と約同じくらい効率的であったということを示す。

【０１８６】

【図７６】図76はインテイン分裂プライム編集因子の編集効率を実証する。HEK239T細胞が、全長PE2またはインテイン分裂PE2、PEgRNA、およびニッキングガイドRNAをコードするプラスミドによってトランスフェクションされた。コンセンサス配列(C末端エクステインのほとんどのアミノ末端残基)が指示されている。2つの部位におけるパーセント編集が示されている:HEK3 +1CTT挿入およびPRNP +6G→T。レプリケートn=3つの独立したトランスフェクション。

【０１８７】

【図７７】図77はインテイン分裂プライム編集因子の編集効率を実証する。編集は、ICV注射によるP0マウスへのSpPE3半分当たり5E10vgおよび小量1E10の核局在GFP:KASHの送達によって、バルクの皮質およびGFP+亜集団の標的化されたディープ配列決定によって評価された。編集因子およびGFPがEFSプロモーターを有するAAV9にパッケージングされた。マウスが注射の3週間後に収穫され、GFP+核がフローサイトメトリーによって単離された。個々のデータポイントは、分析された条件当たり1-2マウスで示されている。

【０１８８】

【図７８】図78はインテイン分裂プライム編集因子の編集効率を実証する。具体的には、図は例20に用いるAV分裂SpPE3構築物を図示する。SpPE3-NおよびSpPE3-Cを別個に発現するAAV粒子による共形質導入はPE3活性を再現する。N末端ゲノムはニッキングsgRNAを発現するU6-sgRNAカセットを含有し、C末端ゲノムはPEgRNAを発現するU6-PEgRNAカセットを含有するということに注意せよ。

【０１８９】

【図７９】図79は、ある種の最適化されたリンカーの編集効率を示す。特に、データは、リンカーが指示されている配列によって置き換えられた種々のバージョンと比較して、現行のリンカーを有するPE2構築物の編集効率(PE2と記される。白色のボックス)を、HEK3、EMX1、FANCF、RNF2遺伝子座において、トランジション、トランスバージョン、挿入、および欠失編集の代表的なPEgRNAについて示す。置き換えリンカーは「1×SGGS」(配列番号174)、「2×SGGS」(配列番号446)、「3×SGGS」(配列番号3889)、「1×XTEN」(配列番号171)、「リンカーなし」、「1×Gly」、「1×Pro」、「1×EAAAK」(配列番号3968)、「2×EAAAK」(配列番号3969)、および「3×EAAAK」(配列番号3970)と言われる。編集効率はPE2の「対照」編集効率に対して相対的に棒グラフフォーマットで測定される。PE2のリンカーはSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS(配列番号127)である。全ての編集はPE3システムという文脈でされた。すなわち、これはPE2編集構築物プラス最適な二次sgRNAニッキングガイドの追加を言う。例21を見よ。

【０１９０】

【図８０】PE2に対して相対的に平均の～倍の効力を取ることは、示されているグラフを生み、1×XTEN(配列番号171)リンカー配列の使用が編集効率を平均で1.14倍改善するということを指示する(n=15)。例21を見よ。

【０１９１】

【図８１】図81は、例22に記載されているとおり、異なるプロモーターからのPEgRNAの転写レベルを図示する。

【０１９２】

【図８２】図82は、未改変のPEgRNAに対して相対的な編集効率に対するPEgRNA構造上の異なる型の修飾のインパクトを図示する。

【０１９３】

【図８３】図83は、HEK3遺伝子の編集を標的化したPE実験を図示する。ニック部位に対して相対的に位置+1における10nt挿入の挿入を特異的に標的化し、PE3を用いた。

【０１９４】

【図８４Ａ】図84Aは、スペーサー、gRNAコア、および伸長アーム(RT鋳型+プライマー結合部位)を有する例示のPEgRNAを図示する。これは、UCUリンカーを介してカップリングされたtRNA分子によってPEgRNAの3'端を修飾されている。tRNAは種々の転写後修飾を包含する。しかしながら、前記修飾は要求されない。

【０１９５】

【図８４Ｂ】図84Bは、PEgRNA構造を改変するために用いられ得るtRNAの構造を図示する。例22を見よ。P1は長さが可変であり得る。P1は、PEgRNA-tRNA融合体のRNAsePプロセシングを防止することを助けるように伸長され得る。

【０１９６】

【図８５】図85はFANCF遺伝子の編集を標的化したPE実験を図示する。ニック部位に対して相対的に位置+5におけるG→Tの変換を特異的に標的化し、PE3構築物を用いた。
【０１９７】
【図８６】図86はHEK3遺伝子の編集を標的化したPE実験を図示する。ニック部位に対して相対的に位置+1における71nt FLAGタグ挿入の挿入を特異的に標的化し、PE3構築物を用いた。
【０１９８】
【図８７】pegRNAが1412Adelを組み入れるN2A細胞のスクリーニングからの結果と、プライマー結合部位(PBS)長さおよび逆転写酵素(RT)鋳型長さの詳細(インデルありおよびなしで示されている)。
【０１９９】
【図８８】pegRNAが1412Adelを組み入れるN2A細胞のスクリーニングからの結果と、プライマー結合部位(PBS)長さおよび逆転写酵素(RT)鋳型長さの詳細(インデルありおよびなしで示されている)。
【０２００】
【図８９】図89は、健康なHSCのβ-グロビン遺伝子の近位(proxy)遺伝子座におけるおよびHEK3における編集の結果を図示する。編集因子対pegRNAおよびニッキングgRNAの濃度を変えている。
【０２０１】
【図９０】図90は、二重フラッププライム編集のある態様の模式図を提供する。DNA標的配列は2つのプライム編集複合体(pegRNA-AおよびpegRNA-Bによってガイドされる)によって作用される。2つのpegRNAは二重らせんの対向する鎖を標的化する。各プライム編集因子(PE2・pegRNA)は単一のDNA鎖にニックを入れ、次いで鋳型としてpegRNAを用いて3'DNAフラップを合成する。2つのプライム編集因子複合体の作用は、DNAの対向する鎖上の2つの3'フラップを含有する中間体の産生をもたらす。2つの3'フラップはそれらの3'端において互いに対して相補的である。3'フラップの3'端のアニールは、2組の二重鎖構造の形成をもたらし、1つの二重鎖は新たなDNA配列を含有する対形成した3'フラップから作られ(赤)、別の二重鎖は元のDNA配列を含有する対形成した5'フラップから作られる(黒)。介在する元のDNA二重鎖(黒い対形成した5'フラップ)の切除は、元のDNA配列を置き換えた所望の新たなDNA配列(赤)を含有する二重にニックを入れられたDNA種を生み出す。両方のニックのライゲーションが編集プロセスを完了する。
【０２０２】
【図９１】図91A～91Bは例7からの結果を提供する。図91Aは、二重プライム編集因子を用いるHEK293T細胞のHEK3部位における新たな22bp配列による90bp配列の置き換えについて、Crispresso2アウトプットアレル表(所望の産物についてアラインメントされた)を示す。所望の産物は配列決定読取の80％超を占める。比較のために、参照出発アレルが、配列決定されたアレルの上に示されている。図91Bは、図91Aに示されている配列置き換えを達成するために用いられたpegRNAの配列を示す。pegRNA1およびpegRNA2はDNA二重らせんの異なる鎖を標的化し、図90に描かれている通り5'の押し除けられたニックを生成する。
【０２０３】
【図９２】図92は、二重フラッププライム編集のためのpegRNAデザインのデザイン態様を示す。pegRNA AおよびpegRNA Bとして図面に示されている2つのpegRNAが二重フラッププライム編集に用いられる。各pegRNAはスペーサー配列(暗い青)を含有し、これはプライム編集複合体を標的DNA部位へとガイドする。2つのpegRNAはDNA二重らせんの対向する鎖を標的化する。他のpegRNAのように、二重フラッププライム編集pegRNAは、逆転写を開始するためにニックを入れられたゲノムDNA鎖にアニールするプライマー結合配列(PBS、緑)と、逆転写酵素による新たなDNAの合成の鋳型となる逆転写鋳型(RT鋳型、明るい青)とを有する3'伸長を含有する。新たに合成された編集された3'フラップが内生5'フラップと競合することを要求する古典的なプライム編集に用

いられるpegRNAとは違って、RT鋳型上に標的部位に対する相同性をコードする必要はない。代わりに、2つの合成された3'フラップの3'端が互いに対する相補性を含有することのみを必要とする(すなわち、3'フラップの3'端は互いの逆相補配列である)。この相補性は、2つの3'フラップがアニールし、所望の編集されたDNA配列の形成を促進することを許す。

【０２０４】

【図９３】図93A～93Bは、二重フラッププライム編集によってBxB1のattBおよびattP部位を組み入れるために二重プライム編集を用いることの例7の結果を示す。図93AはHEK3における38bpのBxB1のattB部位の組み入れを示す。6つのpegRNAが構築され、3つは(＋)鎖を標的化し(A1、A2、およびA3)、3つは(-)鎖を標的化した(B1、B2、およびB3)。これらはRT鋳型上にコードされるattB配列の量が異なり、2つのフラップ間の異なる数の相補的なヌクレオチドに至る。pegRNAの3×3マトリックスが、HEK293T細胞の標的のゲノム上の位置付けにおけるattB配列の組み入れについて評価された。図93Aおよび図93BはHEK3における50bpのBxB1のattP部位の組み入れを示す。6つのpegRNAが構築され、3つは(＋)鎖を標的化し(A1、A2、およびA3)、3つは(-)鎖を標的化した(B1、B2、およびB3)。これらはRT鋳型上にコードされるattP配列の量が異なり、2つのフラップ間の異なる数の相補的なヌクレオチドに至る。pegRNAの3×3マトリックスが、HEK293T細胞の標的のゲノム上の位置付けにおけるattP配列の組み入れについて評価された。図93Aおよび図93Bの両方の編集について、attBまたはattP部位の組み入れは、2つのニック部位間に位置付けられるゲノムDNA配列の90bpの付随的な欠失を有して生起する。

【０２０５】

【図９４】図94は、二重フラッププライム編集によるヒトセーフハーバー遺伝子座におけるBxB1のattBおよびattP部位の組み入れの結果を示す。HEK293T細胞のAAVS1遺伝子座におけるBxB1のattP部位(左)またはCCR5遺伝子座におけるBxB1のattB部位(右)の組み入れ。正しい編集が青(AAVS1)および赤(CCR5)で示され、インデル副産物は灰色で示されている。

【０２０６】

【図９５】図95は四重フラッププライム編集によるゲノム配列逆位の模式図を提供する。ゲノムDNAのある領域が逆位のために標的化される(緑およびオレンジのセグメント)。4つのpegRNAがPE2プライム編集因子と共に細胞に送達される。pegRNAの1つのペアはある単一のゲノムDNA鎖を標的化し、2つの相補的なDNAフラップの合成の鋳型となり(AおよびA'、青)、第2のペアは別のゲノムDNA鎖を標的化し、直交的なDNA配列を有する2つの相補的なDNAフラップの合成の鋳型となる(BおよびB'、ピンク)。相補的なフラップはアニールして3'オーバーハング二重鎖を形成する。5'オーバーハング二重鎖は内生細胞性の修復酵素によって切除される。ニックがライゲーションされて、逆位したDNA配列(緑およびオレンジのセグメント)およびpegRNAを鋳型とする配列を逆位接合部(青およびピンクのセグメント)に含有する産物アレルを生ずる。

【０２０７】

【図９６】図96はAAVS1逆位接合部のアンプリコン配列決定の結果を示す。四重フラップによってプライミングされる編集戦略を用いるHEK293T細胞のAAVS1遺伝子座における2.7kb逆位のCRISPResso2分析アウトプット。予想される逆位接合部のPCR増幅および配列決定は、逆位の接合部に挿入されたBxb1のattPまたはattB配列を有する所望の産物を示した。

【０２０８】

【図９７】図97A～97Bは、四重フラッププライム編集を用いるゲノム上への環状DNAプラスミドの標的化された取り入れの結果を示す。(図97A)ゲノムDNAのある領域およびプラスミドDNAのある領域が四重フラッププライム編集取り入れのために標的化される。4つのpegRNAがPE2プライム編集因子と共に細胞に送達される。2つのpegRNAが相補配列の鋳型となり、1つは単一のゲノムDNA鎖を標的化し、別は単一のプラスミドD

NA鎖を標的化する(青いフラップを生成する)。他の2つのpegRNAは、第1の2つのpegRNAのものに対して対向するゲノムDNAおよびプラスミドDNA鎖を標的化し、それらは第1のペアに対して直交的である2つの相補的なDNAフラップの合成の鋳型となる(ピンク)。相補的なフラップはアニールして、3'オーバーハング二重鎖を形成する。5'オーバーハング二重鎖は内生細胞性の修復酵素によって切除される。ニックがライゲーションされて、取り入れられたプラスミドDNA配列を含有する産物アレル(緑およびオレンジのセグメント)および取り入れ接合部におけるpegRNAを鋳型とする配列(青およびピンクのセグメント)を生ずる。(図97B)pegRNAを鋳型とするattP配列によって橋かけされたプラスミドバックボーンおよびゲノムDNA配列を示す、予期される接合部のアンプリコン配列決定のCRISPResso2分析。

【０２０９】

【図９８】図98A～98Bは、四重フラッププライム編集による標的化された染色体転座の結果を示す。(図98A)pegRNAが異なる染色体上の2つの領域を標的化する。相補的な3'DNAフラップが2つの染色体配列を橋かけし、転座の向きを導く。(図98B)HEK239T細胞のMYCおよびTIMM44遺伝子座の間の標的化された転座。染色体8上のMYC遺伝子座および染色体19上のTIMM44遺伝子座の間の転座からの予想される接合部のアンプリコン配列決定からのCRISPResso2分析アウトプット。配列決定読取の大多数は所望のアレル配列に対応する。

【０２１０】

【図９９】図99は、IDS遺伝子座における二重フラッププライム編集によるBxB1のattBおよびattP部位の組み入れを示す。HEK293T細胞がPE2およびpegRNAの異なるペアによってトランスフェクションされた(例えば、第1のカラムでは、順方向にattP部位を組み入れるための鋳型を有するpegRNAのA1_aおよびpegRNAのB2_a)。効率がHTSによって測定された。このデータは、二重フラップ編集が最高で～80%の効率でIDS遺伝子座に目当ての配列を首尾良く挿入し得るということを示す。

【０２１１】

【図１００】図100A～100Bは、二重フラップによって媒介される重複を記載する。図100Aは、293T細胞のAAVS1遺伝子座における二重フラップによって媒介される重複を示す模式図である。図100Bは、AAVS1における遺伝子配列の重複を誘導するためにPE2に二重フラップpegRNAを用いることの結果を示す。

【０２１２】

【図１０１】図101は、多重フラップによって誘導される新たな転座MYC-CCR5を示す。MYC-CCR5転座が四重フラップpegRNAおよびPE2によって誘導された。MYC-CCR5転座イベントが四重pegRNAによって誘導された。pegRNAの4つの異なるセットがHEK293T細胞において試験された。導出されたchr8およびchr3の間の転座接合部産物が接合部プライマーによって増幅された。予想される接合部アレルに対してアラインメントされた読取の%がグラフに示されている。結果は、四重フラップが、MYCおよびCCR5遺伝子の転座を媒介し得、産物純度が接合部1において100%近くおよび接合部2において～50%であるということを示している。代表的なアレルのプロットは、接合部1における予想されるアレル配列に対してアラインメントされた配列を示す。

【０２１３】

【図１０２】図102A～102Bは、他のヒト細胞株における二重フラップおよび多重フラップ編集を示す。図102Aは、4つの異なるヒト細胞株における二重フラップ編集を示す。HEK293TおよびHeLa細胞が、3つの異なるゲノム遺伝子座(IDS、MYC、およびTIMM44)を編集するための二重pegRNAおよびPE2によってトランスフェクションされた。U2OSおよびK562細胞が同じ構成要素によってヌクレオフェクションされた。二重フラップは、全ての4つのヒト細胞で標的遺伝子座において特にHEK293TおよびK562細胞においてロバストな編集を示した。二重フラップ編集を可能化するための細胞性のメカニズムは多くのヒト細胞型において保存されている。図102Bは、多重フラップ(四重pegRNA)がHeLa細胞のAAVS1における2.7kb逆位を導いたということを示す。

【０２１４】
【図１０３】図103A～103Bは、CCR5遺伝子座におけるHTSによる逆位効率測定の結果を示す。予想される逆位編集アレルのパーセンテージがHTSによって測定された。4つの四重pegRNAセットPE2がそれぞれHEK293T細胞においてトランスフェクションされた。図103Aは、HEK293T細胞のCCR5遺伝子座における二重フラップによって媒介される配列重複(～100nt)を示す。編集効率はHTSの300サイクルペアエンド配列決定分析によると～1.5％を達成する。図103BはHeLa細胞のCCR5遺伝子座における四重フラップによって媒介される配列逆位(～95～117nt)を示す。編集効率はHTSの300サイクルペアエンド配列決定分析によると～1.2％を達成する。この結果は、多重フラップがCCR5遺伝子座において正確に重複および逆位を首尾良く媒介し得るということを示している。標的配列が重複するときの編集特異性は高い(インデルのパーセンテージ＜2％)。
【０２１５】
【図１０４】図104A～104Eは、二重フラップ編集のための標的化された細胞性の修復経路を示す。図104A～104Dでは、HEK293T細胞が、Exo1、Fen1、赤色蛍光タンパク質(対照)、DNA2、Mlh1 neg、およびP53阻害因子を発現するプラスミドによってpegRNAおよびPE2と共にトランスフェクションされた。編集効率はHTSによって測定された。編集効率が候補およびRFP対照の間で比較された。図104Eでは、HEK293T細胞がsiRNAプラスミドならびにpegRNAおよびPE2によって各標的遺伝子座についてトランスフェクションされた。非標的化siRNA(siNT)が対照として用いられた。編集効率はHTSによって測定された。編集効率は各siRNAノックダウンおよびsiNT対照の間で各標的遺伝子座において比較された。HEK293T細胞が、二重pegRNA、PE2、ならびにそれぞれExo1、Fen1、赤色蛍光タンパク質(対照)、DNA2、Mlh1 neg、およびP53阻害因子を発現するプラスミドによってトランスフェクションされた。編集効率はHTSによって測定された。編集効率は候補およびRFP対照の間で比較された。両側の対応のあるスチューデントt検定が、各処置およびRFP対照の間の統計的な違いを測定するために用いられた(P＜0.05、＊;P＜0.01、＊＊;P＜0.001、＊＊＊)。FEN1の過剰発現は全ての4つの標的遺伝子座(MYC、TIMM44、IDS、CCR5)における二重フラップ編集効率を改善する。
【０２１６】
【図１０５】図105A～105Bは、AAVS1遺伝子座における二重フラップによって媒介される配列重複を示す。図105Aは、AAVS1遺伝子座における二重フラップによって媒介される配列重複の模式的なダイアグラムを示す。図105Bは、2つの固有の3'フラップ構造を生成する二重pegRNAを用いることによって、～300bp配列重複が293T細胞のAAVS1遺伝子座に導入されたということを示す。予想されるアレルが特異的なプライマーによって増幅され、HTSに付される。～94％の読取が、重複を有する予想されるアレルに対してアラインメントされる。重複産物は無処置のサンプルでは観察されない。
【０２１７】
【図１０６】図106は、四重フラッププライム編集による標的化されたIDSゲノム配列逆位を示す。ハンター症候群患者の～13％はIDS遺伝子配列の逆位を有することが示されている(Bondeson et al., Human Molecular Genetics, 1995)。四重フラッププライム編集が、HEK293T細胞において～40kbのIDSゲノム配列のこの病原性の逆位を誘導するために適用された。四重pegRNAの6つのセットが、pegRNAおよびPE2によってHEK293T細胞をトランスフェクションすることによって試験された。接合部「ab」および接合部「cd」において逆位した配列を特異的に増幅するためのプライマーが用いられた。予想される逆位したアレル配列の～95％は両方の接合部においてIDS_QF1で観察された。pegRNAの他のセットもまた両方の接合部において高いパーセンテージの予想されるアレル配列を生み出す。逆位した接合部産物は無処置のサンプルでは観察されない。
【０２１８】
【図１０７】図107は、PegRNAの3'モチーフ修飾がIDS遺伝子座における二重フラッ

プ編集効率を改善するということを示す。二重フラップ編集効率をさらに改善するために、シュードノットevoPreQ1モチーフがpegRNAの3'端を保護するために導入された。未修飾およびevoPreQ1修飾二重pegRNAによって生成される編集効率を比較することによって、標的IDS遺伝子座における修飾pegRNAによる編集効率の総体的な増大がある。二重フラップ編集効率の改善は最高で5.3倍に達し得る。

【０２１９】

【図１０８】図108A～108Cは、ツインPEおよびツインPEによって媒介される配列置き換えの概観を示す。図108Aは、ツインPEシステムが、DNAの対向する鎖上に2つのプロトスペーサー配列を含有するゲノムDNA配列を標的化するということを示す。PE2・pegRNA複合体は各プロトスペーサーを標的化し、一本鎖のニックを生成し、所望の挿入配列を含有するpegRNAによってコードされる鋳型を逆転写する。3'DNAフラップの合成およびリリース後には、仮説上の中間体が存在し、編集されたDNA配列を含有するアニールした3'フラップおよび元のDNA配列を含有するアニールした5'フラップを所有する。5'フラップ上に含有される元のDNA配列の切除、次に対応する切除部位に対する3'フラップのライゲーションは、所望の編集された産物を生成する。図108Bは、38bpのBxb1のattB配列によるHEK部位3の90bp配列のツインPEによって媒介される置き換えの例を示す。図108Cは、HEK部位3における図108Bに示される38bpのBxB1のattB部位または50bpのBxb1のattP部位の組み入れについてのHEK293T細胞におけるツインPEの評価を示す。様々な長さの挿入配列の鋳型となるpegRNAを用いる。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【０２２０】

【図１０９】図109A～109Eは、ヒト細胞におけるツインPEによる標的化された配列挿入、欠失、および再コード化を示す。図109Aは、HEK293T細胞のHEK部位3におけるPE3(12bp、36bp、108bp、または321bp)またはツインPE(108bp)によるFKBPコード配列断片の挿入を示す。図109Bは、ツインPEを用いるHEK293T細胞のPAHにおけるエキソン4および7上の配列の再コード化を示す。エキソン4の64bp標的配列が24、36、もしくは59bpのオーバーラップフラップを用いて編集されたか、エキソン7の46bp標的配列が22もしくは42bpのオーバーラップフラップを用いて編集されたか、またはエキソン7の64bp配列が24もしくは47bpのオーバーラップフラップを用いて編集された。編集活性は標準的なpegRNAまたは3'evoPreQ1モチーフを含有するepegRNAを用いて比較された。図109Cは、標的化された欠失を実行するために検討された3つの別種の二重フラップ欠失戦略の模式的なダイアグラムである。「ベーシックアンカー(BA)」ツインPE戦略は、1つのニック部位の3'の恣意的な位置から出発して別のニック部位で終わるフレキシブルな欠失を許す。「ハイブリッドアンカー(HA)」ツインPE戦略は、2つのニック部位間の恣意的に選ばれた位置における配列のフレキシブルな欠失を許す。ここで試験された「プライムDel(PD)」戦略は、1つのニック部位から出発して別のニック部位で終わる配列の欠失を許す。図109Dは、同じプロトスペーサーペアを標的化するBA-ツインPE、HA-ツインPE、またはPD戦略を用いるHEK293T細胞のHEK部位3における配列の欠失を示す。編集活性は標準的なpegRNAまたは3'evoPreQ1モチーフを含有するepegRNAを用いて比較された。図109Eは、BA-ツインPE、PD、ペアリングされたCas9ヌクレアーゼ、またはツインPEによって媒介されるattB配列置き換えを用いるHEK293T細胞のDMD遺伝子座におけるエキソン51配列の欠失を示す。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。DMDエキソン51スキップ実験では、少なくとも2つの独立した生物学的レプリケートが行われた。

【０２２１】

【図１１０】図110A～110Eは、ヒト細胞におけるツインPEおよびBxB1リコンビナーゼによるDNAカーゴの部位特異的なゲノム取り入れを示す。図110Aは、HEK293T細胞のAAVS1遺伝子座におけるBxB1のattP配列の組み入れのためのツインPE・pegRNAペアのスクリーニングを示す。図110Bは、HEK293T細胞のCCR5遺伝子座におけるBxb

1のattB配列の組み入れのためのツインPE・pegRNAペアのスクリーニングを示す。図110Cは、CCR5(4つの最も左側のバー)またはAAVS1(3つの最も右側のバー)を標的化するツインPE・pegRNAペアを用いる5.6kbのDNAドナーの単回トランスフェクションノックインを示す。ツインPE・pegRNAはattBをCCR5にまたはattPをAAVS1に組み入れる。次いで、BxB1は、対応するアタッチメント部位を持つドナーをゲノムアタッチメント部位に取り入れる。図110Dは、531/584ツインPE・pegRNAペアを用いるCCR5における単回トランスフェクションノックインの最適化を示す。鋳型による編集の同一性(attB対attP)、中心のジヌクレオチドの同一性(野生型GT対直交的な変異体GA)、およびフラップ間のオーバーラップの長さは、最も高いノックイン効率を支持する組み合わせを同定するために変えられた。図110Eは、HEK293TおよびHuh7細胞株におけるALBのイントロン1へのBxB1のattB配列の挿入を示す。図110Fは、HEK293TおよびHuh7細胞株のCCR5およびALBにおける単回トランスフェクションノックイン効率の比較を示す。

【0222】

【図111】図111A～111Eは、ヒト細胞におけるツインPEおよびBxb1リコンビナーゼによる部位特異的なゲノム配列逆位を示す。図111Aは、病原性の39kb逆位に至るIDSおよびIDS2の組み換えホットスポット、ならびにIDS逆位変異を組み入れまたは修正するための組み合わせられたツインPE-Bxb1戦略の模式的なダイアグラムである。図111Bは、特異的なDNA標的によるIDSおよびIDS2遺伝子座におけるattPまたはattB組み換え部位挿入の組み入れのためのIDSおよびIDS2におけるpegRNAペアのスクリーニングを示す。図111Cは、逐次的なDNAトランスフェクションによるattPまたはattB挿入のDNA配列決定分析を示す。図111Dは、逆位した接合部1および接合部2における逆位産物純度を示し(逐次的なトランスフェクション)、2つの接合部における首尾良い逆位を指示している。図111Eは接合部における逆位効率の定量を示す(逐次的なトランスフェクションおよび「ワンポット」RNAヌクレオフェクション)。

【0223】

【図112】図112は、ツインPEによるHEK293T細胞のPAHのエキソン10、11、および12の配列の再コード化を示す。エキソン10の64bp標的配列が28bpのオーバーラップフラップを用いて編集されたか、エキソン11の61bpおよび55bp標的配列が25bpのオーバーラップフラップを用いて編集されたか、またはエキソン12の68bpおよび58bp配列がそれぞれ27および24bpのオーバーラップフラップを用いて編集された。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【0224】

【図113】図113は、BxBIプラスミドおよびattP含有ドナーDNAプラスミドによるホモ接合のattB部位挿入を含有するHEK293Tクローン細胞株のトランスフェクションを示す。ddPCRによって測定されたノックイン効率は標的部位において12～17%の間である。

【0225】

【図114】図114は、ツインPEおよびBxBIによって媒介されるワンポットノックインの後のattLおよびattR組み換え産物を含有する予想される接合部配列のHTS測定を示す。産物純度は71～95%の範囲である。値およびエラーバーは3つの独立した生物学的レプリケートの平均およびs.d.を反映する。

【0226】

【図115A】図115Aは、二重pegRNAの縮減されたフラップオーバーラップ長さによるツインPEによって媒介されるattB挿入効率を示す。

【0227】

【図115B】図115Bは、アガロースゲル上の示されたドナーDNAおよびpegRNAプラスミドの間の組み換えを捕捉するための特異的なプライマーによって増幅されたPCR産物を示す。ドナーDNAおよびpegRNAプラスミドの間の組み換えは、より小さいフラップオーバーラップによって縮減された。

【０２２８】
【図１１６】図116は、IDS逆位効率を定量するための開発されたPCR戦略の模式的なダイアグラムである。
【０２２９】
定義
別様に定められない限り、本願において用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の業者によって普通に理解される意味を有する。次の参照は、本発明に用いられる用語の多くの一般的な定義を当業者に提供する: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)。別様に規定されない限り、本願において用いられる次の用語はそれらに帰せられる意味を有する。
【０２３０】
アンチセンス鎖
遺伝学において、二本鎖のDNA内のセグメントの「アンチセンス」鎖は、鋳型鎖であって、3'→5'配向に伸びる(runs)と考えられる。これに反して、「センス」鎖は、5'から3'へ伸びる二本鎖のDNA内のセグメントであって、3'から5'へ伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に相補的である。タンパク質をコードするDNAセグメントのケースにおいて、センス鎖は、転写の最中にその鋳型としてアンチセンス鎖を取り結局(典型的には、常にではない)翻訳を経てタンパク質になるmRNAと同じ配列を有するDNAの鎖である。よって、アンチセンス鎖は、後にタンパク質へ翻訳されるRNAを担い、一方センス鎖は、mRNAとほぼ同一の組成(makeup)を保有する。dsDNAの各セグメントについて、一方がどの方向から読まれるかに応じて、おそらく(センスおよびアンチセンスは視点に相対するから)センスおよびアンチセンスが2組存在するであろう点に留意する。遺伝子産物またはmRNAは結局、dsDNAの一方のセグメントのどちらかの鎖がセンスまたはアンチセンスと称されることを示す。
【０２３１】
二重特異性リガンド
本願において用いられる用語「二重特異性リガンド」または「二重特異性部分」は、2つの異なるリガンド結合ドメインに結合するリガンドを言う。ある態様において、リガンドは低分子化合物またはペプチドまたはポリペプチドである。他の態様において、リガンド結合ドメインは「二量体化ドメイン」であり、これがペプチドタグとしてタンパク質上に組み入れられ得る。種々の態様では、同じかまたは異なる二量体化ドメインを夫々が含む2つのタンパク質が、二重特異性リガンドに対する各二量体化ドメインの結合によって二量体化するように誘導され得る。本願において用いられる「二重特異性リガンド」は同等に「二量体化の化学的誘導因子」または「CID」と言われ得る。
【０２３２】
Cas9
用語「Cas9」または「Cas9ヌクレアーゼ」は、Cas9ドメインまたはそのフラグメントを含む、RNAに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、本明細書に使用されるとき、Cas9の活性もしくは不活性な切断ドメインおよび/またはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質フラグメントである。「Cas9タンパク質」は、全長Cas9タンパク質である。Cas9ヌクレアーゼはまた、ときにcasn1ヌクレアーゼまたはCRISPR(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(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)に対して保護を提供する適応免疫系である。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。CRIS

PRクラスターは転写され、プロセスを受けて(processed)CRISPR RNA(crRNA)になる。II型CRISPR系において、pre-crRNAの修正プロセシングは、transでコードされた低分子(small)RNA(tracrRNA)、内生リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9ドメインを要する。tracrRNAは、pre-crRNAの、リボヌクレアーゼ3に補助された(-aided)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、スペーサーに相補的な線状または環状のdsDNA標的をエンドヌクレアーゼ的に切断する。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的に切られ、次いで3'-5'エキソヌクレアーゼ的に切り取られる。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を要する。しかしながら、単一ガイドRNA(「sgRNA」、または単に「gNRA」)は、crRNAとtracrRNAとの両方の側面を単一RNA種中へ組み込むために、改変され得る。例として、Jinek M.,Chylinski K.,Fonfara I.,Hauer M.,Doudna J.A.,Charpentier E.Science 337:816-821(2012)を参照(この内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)。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は当業者に周知である(例として、"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes."Ferretti et al.,J.J.,McShan W.M.,Ajdic D.J.,Savic D.J.,Savic G.,Lyon K.,Primeaux C.,Sezate S.,Suvorov A.N.,Kenton S.,Lai H.S.,Lin S.P.,Qian Y.,Jia H.G.,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(これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる))。Cas9オルソログは、これらに限定されないが、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明らかであろう。またかかるCas9ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski, Rhun, and Charpentier,"The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems"(2013)RNA Biology 10:5,726-737(この内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)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。いくつかの態様において、Cas9ヌクレアーゼは、DNA切断ドメインを部分的に損なうかまたは不活性化させる1以上の突然変異を含む。

【０２３３】

ヌクレアーゼが不活性化されたCas9ドメインは、互換的に「dCas9」タンパク質(ヌクレアーゼが「不活性型」のCas9を表す)と称されてもよい。不活性なDNA切断ドメインを有するCas9ドメイン(またはそのフラグメント)を生成するための方法は知られている(例として、Jinek et al.,Science.337:816-821(2012);Qi et al.,"Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression"(2013)Cell.28;152(5):1173-83を参照(これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる))。例えば、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(silence)得る。例えば、突然変異D10AおよびH840Aは、S.pyogenes Cas9のヌクレアーゼ活性を完全に不活性化する(Jinek et al.,Science.337:816-821(2012);Qi et al.,Cell.28;152(5):1173-83(2013))。いくつかの態様において、Cas9のフラグメントを含むタンパク質が提供される。例えば

、いくつかの態様において、タンパク質は、2つのCas9ドメイン:(1)Cas9のgRNA結合ドメイン;または(2)Cas9のDNA切断ドメインのうち一方を含む。いくつかの態様において、Cas9を含むタンパク質またはそのフラグメントは、「Cas9バリアント」と称される。Cas9バリアントは、Cas9またはそのフラグメントとの相同性を共有する。例えば、Cas9バリアントは、野生型Cas9(例として、配列番号18のSpCas9)と、少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、少なくとも約99.8%同一、または少なくとも約99.9%同一である。いくつかの態様において、Cas9バリアントは、野生型Cas9(例として、配列番号18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、21、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、またはそれ以上のアミノ酸変化を有していてもよい。いくつかの態様において、Cas9バリアントは、そのフラグメントが、野生型Cas9(例として、配列番号18のSpCas9)の対応するフラグメントと、少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、または少なくとも約99.9%同一となるように、配列番号XCas9のフラグメント(例として、gRNA結合ドメインまたはDNA切断ドメイン)を含む。いくつかの態様において、フラグメントは、対応する野生型Cas9(例として、配列番号18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。

【0234】

cDNA

用語「cDNA」は、RNA鋳型からコピーされたDNAの鎖を指す。cDNAは、RNA鋳型に相補的である。

【0235】

循環置換体

本明細書に使用されるとき、用語「循環置換体(circular permutant)」は、タンパク質のアミノ酸配列中に現れるアミノ酸の順序の変化を伴うタンパク質の構造上の立体配置における変化である循環置換(circular permutation)を含むタンパク質またはポリペプチド(例として、Cas9)を指す。換言すれば、循環置換体は、野生型対応物と比較してN末端およびC末端が変更されたタンパク質であり、例として、野生型タンパク質のC末端半分が新しいN末端半分になっている。循環置換(またはCP)は本質的に、そのN末端およびC末端が接続され、しばしばペプチドリンカーをもつ、タンパク質1次配列の形態上の再配置であるが、同時にその配列を異なる位置にて分裂させることで、隣接していた新しいN末端およびC末端が創出される。その結果は、接続が異なるが、しばしば同じか全体的には同様の3次元の(3D)形状を有し得るタンパク質構造であって、おそらく、改善または変更された特徴(タンパク分解への低減された感受性、改善された触媒活性、変更された基質結合もしくはリガンド結合、および/または改善された熱安定性を包含する)を包含する。循環置換タンパク質は天然に存在し得る(例として、コンカナバリンAおよびレクチン)。加えて、循環置換は、翻訳後修飾の結果として生じ得るか、または組換え技法を使用して改変されてもよい。

【0236】

循環置換されたCas9

用語「循環置換されたCas9」は、循環置換体として生じたものであり、これによってそのN末端およびC末端が局所的に再配置された、いずれのCas9タンパク質またはその

バリアントも指す。循環置換されたかかるCas9タンパク質(「CP-Cas9」)、またはそれらのバリアントは、ガイドRNA(gRNA)と複合体化されたときのDNAへの結合能を保持している。Oakes et al.,"Protein Engineering of Cas9 for enhanced function,"Methods Enzymol,2014,546:491-511およびOakes et al.,"CRISPR-Cas9 Circular Permutants as Programmable Scaffolds for Genome Modification,"Cell,January10,2019,176:254-267を参照(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。本開示は、これまでに知られているいずれのCP-Cas9も企図するか、または新しいCP-Cas9を、その結果得られた循環置換タンパク質がガイドRNA(gRNA)と複合体化されたときのDNAへの結合能を保持している限り、使用する。例示のCP-Cas9タンパク質は、配列番号77～86である。

【０２３７】

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用いられ、CRISPR関連タンパク質(Cas9およびそのホモログを包含する)およびCRISPR関連RNAのアレイと併せて、有効に原核生物免疫防御システムを成す。天然では、CRISPRクラスターはCRISPR RNA(crRNA)へと転写およびプロセシングされる。ある種の型のCRISPRシステム(例えば、II型CRISPRシステム)では、プレ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)、内生リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を要求する。tracrRNAはプレcrRNAのリボヌクレアーゼ3によって支援されるプロセシングのためのガイドとしての用をなす。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標的をエンド的に切断する。具体的には、crRNAに対して相補的でない標的鎖が第1にエンド的にカットされ、次いで3'-5'エキソ的にトリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「sgRNA」または単純に「gNRA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の側面を単一のRNA種のガイドRNAに組み込むようにして操作され得る。例えば、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。Cas9はCRISPR反復配列上の短いモチーフ(PAMまたはプロトスペーサー隣接モチーフ)を認識して、自己対非自己を見分けることを助ける。CRISPR生物学ならびにCas9ヌクレアーゼ配列および構造は当業者には周知である(例えば、"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes."Ferretti et al.,J.J.,McShan W.M.,Ajdic D.J.,Savic D.J.,Savic G.,Lyon K.,Primeaux C.,Sezate S.,Suvorov A.N.,Kenton S.,Lai H.S.,Lin S.P.,Qian Y.,Jia H.G.,Najar F.Z.,Ren Q.,Zhu H.,Song L.,White J.,Yuan X.,Clifton S.W.,Roe B.A.,McLaughlin R.E.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:4658-4663(2001);"CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III."Deltcheva E.,Chylinski K.,Sharma C.M.,Gonzales K.,Chao Y.,Pirzada Z.A.,Eckert M.R.,Vogel J.,Charpentier E.,Nature 471:602-607(2011);および"A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity."Jinek M.,Chylinski K.,Fonfara I.,Hauer M.,Doudna J.A.,Charpentier E.Science 337:816-821(2012)を見よ。これらの夫々の内容全体は参照によって本願に組み込まれる)。Cas9オーソログはS. pyogenesおよびS. thermophilusを包含するがこれらに限定されない種々の種において記載されている。追加の好適なCas9ヌクレアーゼおよび配列は本開示に基づいて当業者には明らかであろう。かかるCas9ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski,Rhun,and Charpentier,"The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems"(2013)RNA Biology 10:5,726-737に開示されている生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する;これの内容全体は参

照によって本願に組み込まれる。

【０２３８】

ある種の型のCRISPRシステム(例えば、II型CRISPRシステム)では、プレ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)、内生リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を要求する。tracrRNAは、プレcrRNAのリボヌクレアーゼ3によって支援されるプロセシングのためのガイドとしての用をなす。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的に切断する。具体的には、crRNAに対して相補的でない標的鎖が第1にエンド的にカットされ、次いで3'-5'エキソ的にトリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「sgRNA」または単純に「gRNA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の態様を単一のRNA種のガイドRNAに組み込むようにして操作され得る。

【０２３９】

一般的に、「CRISPRシステム」は、集合的に、CRISPR関連(「Cas」)遺伝子の発現に関わるかまたはそれの活性を導く転写物および他のエレメントを言い、Cas遺伝子、tracr(トランス活性化CRISPR)配列(例えばtracrRNAまたは活性な部分的なtracrRNA)、tracr mate配列(内生CRISPRシステムという文脈において、「ダイレクト反復」およびtracrRNAによってプロセ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(内生CRISPRシステムという文脈において「スペーサー」ともまた言われる)、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。

【０２４０】

<u>DNA合成鋳型</u>

本明細書に使用されるとき、用語「DNA合成鋳型」は、プライム編集因子のポリメラーゼによって鋳型鎖(所望の編集を含有しており、次いでプライム編集の機序を通して、対応する内生DNAの鎖を標的部位にて置き換える、3'単鎖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。様々な態様において、DNA合成鋳型は、図3A(5'伸長アームを含むPEgRNAの文脈(context)において)、図3B(3'伸長アームを含むPEgRNAの文脈において)、図3C(内部伸長アームの文脈において)、図3D(3'伸長アームの文脈において)、および図3E(5'伸長アームの文脈において)に示される。伸長アームは、DNA合成鋳型を包含しており、DNAまたはRNAから構成されていてもよい。RNAのケースにおいて、プライム編集因子のポリメラーゼは、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のケースにおいて、プライム編集因子のポリメラーゼは、DNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。様々な(例として、図3D～3Eに描かれるとおりの)態様において、DNA合成鋳型(4)は、「編集鋳型」および「相同アーム」、ならびに任意の5'末修飾領域e2の全部または一部を含んでいてもよい。つまり、e2領域の性質に応じて(例として、これが、ヘアピン、トウループ、またはステム/ループの2次構造を包含するかどうかに関わらず)、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'伸長アームのケースにおいて、DNA合成鋳型(3)は、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によるDNAの単鎖の合成のための鋳型として動作してもよい、プライマー結合部位(PBS)の5'末からgRNAコアの3'末までに及ぶ伸長アーム(3)の部分を包含し得る。5'伸長アームのケースにおいて、DNA合成鋳型(3)は、PEgRNA分子の5'末から編集鋳型の3'末までに及ぶ伸長アーム(3)の部分を包含し得る。好ましくは、DNA合成鋳型は、3'伸長アームまたは5'伸長アームのいずれかを有するPEgRNAsのプライマー結合部位(PBS)を排除する。本明細書に記載のある態様(例として、図71A)は、編集鋳型および相同アーム、すなわち、DNA合成の最中に鋳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鋳型」を指す。用語「RT鋳型」は、用語「DNA合成鋳型」と等価である。

【０２４１】
トランスプライム編集のケースでは(例えば、図3Gおよび図3H)、プライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鋳型は、トランスプライム編集因子RNA鋳型(tPERT)と言われる別個の分子へと操作され得る。
【０２４２】
二量体化ドメイン
用語「二量体化ドメイン」は、二重特異性リガンドの結合ドメインに結合するリガンド結合ドメインを言う。「第1の」二量体化ドメインは二重特異性リガンドの第1の結合部分に結合し、「第2の」二量体化ドメインは同じ二重特異性リガンドの第2の結合部分に結合する。第1の二量体化ドメインが(例えば、本願において論じられるとおりPEを介して)第1のタンパク質に融合され、第2の二量体化ドメインが(例えば、本願において論じられるとおりPEを介して)第2のタンパク質に融合されるときには、第1および第2のタンパク質は二重特異性リガンドの存在下において二量体化し、二重特異性リガンドは、第1の二量体化ドメインに結合する少なくとも1つの部分と第2の二量体化ドメインに結合する少なくとも別の部分とを有する。
【０２４３】
下流
本明細書に使用されるとき、用語「上流」および「下流」は、5'→3'方向に配向された核酸分子(単鎖または二本鎖であるかに関わらず)中に位置付けられた少なくとも2つの要素の線状の位置を定義する相対的な用語である。とりわけ、第1要素が第2要素に対して5'のどこかに位置付けられている場合、第1要素は、核酸分子中、第2要素の上流にある。例えば、SNPがニック部位の5'側にある場合、SNPは、Cas9に誘導されたニック部位の上流にある。逆に言うと、第1要素が第2要素に対して3'のどこかに位置付けられている場合、第1要素は、核酸分子中、第2要素の下流にある。例えば、SNPがニック部位の3'側にある場合、SNPは、Cas9に誘導されたニック部位の下流にある。核酸分子は、DNA(二本鎖もしくは単鎖)、RNA(二本鎖もしくは単鎖)、またはDNAとRNAとのハイブリッドであり得る。二本鎖分子のどちらの鎖を考慮するのか選択する必要がある場合を除き、上流および下流という用語が核酸分子の単鎖にのみ言及するところ、分析は単鎖核酸分子および二本鎖分子について同じである。しばしば、少なくとも2つの要素の相対的な位置を決定するのに使用され得る二本鎖のDNAの鎖は、「センス」鎖または「コード」鎖である。遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'へ伸びる二本鎖DNA内セグメントであって、3'から5'へ伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に相補的である。よって、例として、SNP核酸塩基がセンス鎖またはコード鎖上のプロモーターの3'側にある場合、SNP核酸塩基はゲノムDNA(二本鎖である)中のプロモーター配列の「下流」にある。
【０２４４】
編集鋳型
用語「編集鋳型」は、ポリメラーゼ、例えばDNA依存性DNAポリメラーゼ、RNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)によって合成される一本鎖3'DNAフラップ上に所望の編集をコードする伸長アームの部分を言う。本明細書に記載のある態様(例として、図71A)は、編集鋳型と相同アームとの両方一緒、すなわち、DNA合成の最中に鋳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鋳型」を指す。用語「RT編集鋳型」はまた、用語「DNA合成鋳型」とも等価であるが、ここでRT編集鋳型は、逆転写酵素であるポリメラーゼを有するプライム編集因子の使用を反映し、DNA合成鋳型は、いずれのポリメラーゼも有するプライム編集因子の使用をより広く反映する。
【０２４５】
有効量
本願において用いられる用語「有効量」は、所望の生物学的応答を誘起するために十分である生物活性薬剤の量を言う。例えば、いくつかの態様では、プライム編集因子(PE)の有効量は、標的部位ヌクレオチド配列、例えばゲノムを編集するために十分である編集

因子の量を言い得る。いくつかの態様では、本願において提供されるプライム編集因子(PE)の、例えばニッカーゼCas9ドメインおよび逆転写酵素を含む融合タンパク質の有効量は、融合タンパク質によって特異的に結合および編集される標的部位の編集を誘導するために十分である融合タンパク質の量を言い得る。当業者には了解されるであろうとおり、薬剤、例えば融合タンパク質、ヌクレアーゼ、ハイブリッドタンパク質、タンパク質二量体、タンパク質(またはタンパク質二量体)およびポリヌクレオチドの複合体、またはポリヌクレオチドの有効量は、例えば、所望の生物学的反応、例えば編集されるべき特定のアレル、ゲノム、または標的部位、標的化されようとする細胞または組織、および用いられようとする薬剤のような種々の因子に依存して変わり得る。

【０２４６】

エラーを起こしやすい逆転写酵素

本明細書に使用されるとき、用語「エラーを起こしやすい」逆転写酵素(またはより広くは、いずれのポリメラーゼ)は、天然に存在するか、または野生型M-MLV逆転写酵素の誤差率未満の誤差率を有する別の逆転写酵素(例として、野生型M-MLV逆転写酵素)に由来する逆転写酵素(またはより広くは、いずれのポリメラーゼ)を指す。野生型M-MLV逆転写酵素の誤差率は、1誤差の範囲が15,000(より高い)～27,000(より低い)にあると報告されている。15,000中の1の誤差率は6.7×10^{-5}の誤差率に相当する。27,000中の1の誤差率は3.7×10^{-5}の誤差率に相当する。Boutabout et al.(2001)"DNA synthesis fidelity by the reverse transcriptase of the yeast retrotransposon Ty1,"Nucleic Acids Res 29(11):2217-2222を参照(これは参照により本明細書に組み込まれる)。よって、本出願の目的において、用語「エラーを起こしやすい」は、15,000核酸塩基の組み込み中1より大きい誤差(6.7×10^{-5}またはこれより高い)、例として、14,000核酸塩基中1誤差(7.14×10^{-5}もしくはこれより高い)、13,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(7.7×10^{-5}もしくはこれより高い)、12,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(7.7×10^{-5}もしくはこれより高い)、11,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(9.1×10^{-5}もしくはこれより高い)、10,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(1×10^{-4}または0.0001もしくはこれより高い)、9,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00011もしくはこれより高い)、8,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00013もしくはこれより高い)、7,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00014もしくはこれより高い)、6,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00016もしくはこれより高い)、5,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.0002もしくはこれより高い)、4,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00025もしくはこれより高い)、3,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00033もしくはこれより高い)、2,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.00050もしくはこれより高い)、あるいは1,000核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.001もしくはこれより高い)、あるいは500核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.002もしくはこれより高い)、あるいは250核酸塩基またはこれより少ない中で1誤差(0.004もしくはこれより高い)である誤差率を有する、それらRTを指す。

【０２４７】

エクステイン

本願において用いられる用語「エクステイン」は、インテインによってフランキングされ、タンパク質スプライシングのプロセスの間に別のエクステインにライゲーションされて成熟したスプライシングされたタンパク質を形成するポリペプチド配列を言う。典型的には、インテインは2つのエクステイン配列によってフランキングされ、これらはインテインがそれ自体の切除を触媒するときに一緒にライゲーションされる。エクステインは、従って、mRNA上に見出されるエキソンに対するタンパク質アナログである。例えば、インテインを含むポリペプチドは構造エクステイン(N)-インテイン-エクステイン(C)であり得る。インテインの切除および2つのエクステインのスプライシング後に、もたらされる構造はエクステイン(N)-エクステイン(C)および遊離のインテインである。種々の構

成では、エクステインは、夫々が分裂インテインに融合された別個のタンパク質(例えば、Cas9またはPE融合タンパク質の半分)であり得、分裂インテインの切除はエクステイン配列のスプライシングを一緒に引き起こす。

【０２４８】

伸長アーム

用語「伸長アーム」は、数種の機能(逆転写酵素のためのプライマー結合部位および編集鋳型を包含する)を提供するPEgRNAのヌクレオチド配列構成要素を指す。いくつかの態様、例として、図3Dにおいて、伸長アームは、ガイドRNAの3'末にて位置付けられる。他の態様、例として、図3Eにおいて、伸長アームは、ガイドRNAの5’末にて位置付けられる。いくつかの態様において、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'→3'方向に以下の構成要素:相同アーム、編集鋳型、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が5'→3'方向であるから、相同アーム、編集鋳型、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ムされると、編集鋳型を相補的な鋳型鎖として使用して単鎖DNAを重合するように、5'→3'方向にある。伸長アームの長さなどのさらなる詳細は、本明細書に記載の他のどこかに記載されている。

【０２４９】

伸長アームはまた、図3G(最上列)に実例として示されるとおり、一般に2つの領域:プライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鋳型を含むものとしても記載されていてもよい。プライマー結合部位は、プライム編集因子複合体によってニックが入れられるようになり、これによってニックが入った内生鎖上に3'末が晒されたとき、標的部位の内生DNA鎖から形成されるプライマー配列へ結合する。本明細書に説明されるとおり、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(すなわち、プライマー配列の3')をもつ二重鎖領域を創出し、これは次いで、晒された3'末からDNA合成鋳型の長さに沿ってDNAの単鎖を重合し始めるポリメラーゼのための基質を提供する。単鎖DNA産物の配列は、DNA合成鋳型の相補体である。重合は、重合が終止するまでDNA合成鋳型(または伸長アーム)の5'へ続く。よって、DNA合成鋳型は、プライム編集因子複合体のポリメラーゼによって単鎖DNA産物(すなわち、所望の遺伝子編集情報を含有する3'単鎖DNAフラップ)中へコードされる伸長アームの部分を表し、前記単鎖DNA産物は、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生DNA鎖に置き換える。理論に拘泥されないが、DNA合成鋳型の重合は、終止という事象まで、伸長アームの5'末へ続く。重合は、これらに限定されないが、(a)PEgRNAの5'末端に達すること(例として、5'伸長アームのケースにおいて、DNAポリメラーゼが単に鋳型を使い果たす)、(b)とおり抜けられないRNA2次構造(例として、ヘアピンもしくはステム/ループ)に達すること、あるいは(c)複製終止シグナル、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などの核酸形態上のシグナルに達すること、を包含する様々な形で終止することもある。

【０２５０】

フラップエンドヌクレアーゼ(例として、FEN1)

本明細書に使用されるとき、用語「フラップエンドヌクレアーゼ」は、5'単鎖DNAフラップ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)の最中に形成された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。本明細書に記載のプライム編集方法は、内生で供給されるフラップエンドヌクレアーゼ、またはプライム編集の最中に標的部位にて形成される内生DNAの5'フラップを除去するのにtransで提供されるものを利用してもよい。フラップエンドヌクレアーゼは、当該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、およびBalakrishnan et al.,"Flap Endonuclease 1,"Annu Rev Biochem,2013,Vol 82:119-138(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)の記載から見出され得る。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１】

説明	配列	配列番号
FEN1 野生型	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKF TKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVK AGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSR ILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSI EEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKW SEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD DFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	配列番号7

【０２５１】

機能的等価物

用語「機能的等価物」は、機能は等価であるが構造は第1生体分子と必ずしも等価ではない第2生体分子を指す。例えば、「Cas9等価物」は、Cas9と同じかまたは実質的に同じ機能を有するが、必ずしも同じアミノ酸配列は有さないタンパク質を指す。本開示の文脈において、本明細書は通してずっと「タンパク質X、またはその機能的等価物」を指す。これに関連して、タンパク質Xの「機能的等価物」は、タンパク質Xの等価機能を担持する、いずれのホモログ、パラログ、フラグメント、天然に存在するバージョン、改変バージョン、突然変異バージョン、または合成バージョンを受け入れる。

【０２５２】

融合タンパク質

用語「融合タンパク質」は、本明細書に使用されるとき、少なくとも2つの異なるタンパク質から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)部分にて、またはカルボキシ末端(C末端)タンパク質にて位置付けられ、よって「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」の夫々を形成してもよい。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向かわせる、Cas9のgRNA結合ドメイン)と、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とを含んでいてもよい。別の例は、逆転写酵素と融合したCas9またはその等価物を包含する。本明細書に提供されるタンパク質のいずれも、当該技術分野において知られているいずれの方法によって産生されてもよい。例えば、本明細書に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とくに適した、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、Green and Sambrook, Molecular Cloning:A Laboratory Manual(4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2012)(これらの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる))によって記載されるものを包含する。

【０２５３】

着目した遺伝子(Gene of interest)(GOI)

用語「着目した遺伝子」または「GOI」は、着目した生体分子(例として、タンパク質またはRNA分子)をコードする遺伝子を指す。着目したタンパク質は、いずれの細胞内タンパク質、膜タンパク質、または細胞外タンパク質、例として、核内タンパク質、転写因子、核膜輸送体、細胞内オルガネラ関連タンパク質、膜受容体、触媒タンパク質、および酵素、治療用タンパク質、膜タンパク質、膜輸送タンパク質、シグナル伝達タンパク質、

または免疫学的タンパク質(例として、IgGまたは他の抗体タンパク質)、等々を包含し得る。着目した遺伝子はまた、これらに限定されないが、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、低分子核内RNA(snRNA)、アンチセンスRNA、ガイドRNA、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、および無細胞RNA(cfRNA)を包含するRNA分子もコードしていてもよい。

【０２５４】

ガイドRNA(「gRNA」)

本明細書に使用されるとき、用語「ガイドRNA」は、大部分が一般的にCRISPR-Cas9のCasタンパク質に関連する具体的な型のガイド核酸であって、Cas9に結び付いて、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)へ向かわせる。しかしながら、この用語はまた、天然に存在するかもしくは天然には存在しない(例として、改変または組換え)かに関わらず、Cas9等価物、ホモログ、オルソログ、またはパラログに結び付き、またCas9等価物を特定の標的ヌクレオチド配列へ局在化するよう別にプログラムする、等価なガイド核酸分子も受け入れる。Cas9等価物は、Cpf1(V型CRISPR-Cas系)、C2c1(V型CRISPR-Cas系)、C2c2(VI型CRISPR-Cas系)およびC2c3(V型CRISPR-Cas系)を包含する、いずれの型のCRISPR系(例として、II型、V型、VI型)からの他のnapDNAbpも包含していてもよい。さらなるCas等価物は、Makarova et al.,"C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector,"Science 2016;353(6299)(この内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。ガイドRNAの例示の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配列をデザインするための方法も、本明細書に提供されている。本明細書に使用されるとき、「ガイドRNA」はまた、本明細書に開示のプライム編集方法および組成物のために発明された「プライム編集ガイドRNA」(または「PEgRNA」)と呼ばれる修飾形態のガイドRNAと対比させるために「既存のガイドRNA」とも称されてもよい。

【０２５５】

ガイドRNAまたはPEgRNAは、これらに限定されないが、以下を包含する様々な構造要素を含んでいてもよい:

【０２５６】

スペーサー配列－標的DNA中のプロトスペーサーへ結合するガイドRNAまたはPEgRNA(長さが約20ntを有する)中の配列。

【０２５７】

gRNAコア(またはgRNA骨格もしくは主鎖配列)－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スペーサー/標的化配列を包含していない。

【０２５８】

伸長アーム－PEgRNAの3'端または5'端の一本鎖伸長。これは、プライマー結合部位とポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)によって目当て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合成鋳型配列とを含む。これが、次いで、対応する内生鎖を置き換えることによって内生DNA上に取り入れし、それによって所望の遺伝子変化を組み入れる。

【０２５９】

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み得る。

【０２６０】

相同アーム

用語「相同アーム」は、結果として得られる、逆転写酵素にコードされた単鎖DNAフラップ(内生鎖を置き換えることによって標的DNA部位中へ取り入れられる)の部分をコードする伸長アームの部分(単数または複数)を指す。相同アームによってコードされる単鎖DNAフラップの部分は、標的DNA配列の非編集済鎖に相補的であって、内生鎖に取っ

て代わることおよびその場所において単鎖DNAフラップとアニールすることを容易にし、これによって編集が組み入れられる。この構成要素は他のどこかでさらに定義される。定義上、それは本明細書に記載のプライム編集因子のポリメラーゼによってコードされるので、相同アームはDNA合成鋳型の一部である。

【０２６１】

宿主細胞

用語「宿主細胞」は、本明細書に使用されるとき、本明細書に記載のベクター、例として、Cas9もしくはCas9等価物と逆転写酵素とを含む融合タンパク質をコードする核酸分子を含むベクターの宿主となり(host)複製してこれを発現し得る細胞を指す。

【０２６２】

インテイン

本願において用いられる用語「インテイン」は、生命の全てのドメインからの生物に見出される自己プロセシングポリペプチドドメインを言う。インテイン(介在タンパク質)は、タンパク質スプライシングとして公知の固有の自己プロセシングイベントを実行する。これにおいては、それは、2つのペプチド結合の切断によってより大きい前駆体ポリペプチドからそれ自体を切除、プロセスにおいて、新たなペプチド結合の形成によってフランキングするエクステイン(外部タンパク質)配列同士をライゲーションする。インテイン遺伝子は他のタンパク質コード遺伝子とインフレームで埋め込まれて見出されるので、この再構成は翻訳後に(または共翻訳的に)生起する。さらにその上、インテインによって媒介されるタンパク質スプライシングは自発的である;それは、外部の因子またはエネルギー源ではなくインテインドメインのフォールディングのみを要求する。このプロセスは、「分裂インテイン」によるトランスタンパク質スプライシングの天然のプロセスと対比して、シスタンパク質スプライシングとしてもまた公知である。インテインは自己スプライシングRNAイントロンのタンパク質等価物であり(Perler et al.,Nucleic Acids Res.22:1125-1127(1994)を見よ)、これらは前駆体タンパク質からのそれら自体の切除を触媒し、エクステインとして公知のフランキングするタンパク質配列の付随的融合を有する(Perler et al.,Curr.Opin.Chem.Biol.1:292-299(1997);Perler,F.B.Cell 92(1):1-4(1998);Xu et al.,EMBO J.15(19):5146-5153(1996)において総説されている)。

【０２６３】

本願において用いられる用語「タンパク質スプライシング」は、前駆体タンパク質の内側領域(インテイン)が切り出され、タンパク質のフランキング領域(エクステイン)同士がライゲーションされて、成熟したタンパク質を形成するプロセスを言う。この天然のプロセスは、原核生物および真核生物両方からの数々のタンパク質で観察されている(Perler,F.B.,Xu,M.Q.,Paulus,H.Current Opinion in Chemical Biology 1997,1,292-299;Perler,F.B.Nucleic Acids Research 1999,27,346-347)。インテイン単位は、タンパク質スプライシングを触媒するために必要とされる必要な構成要素を含有し、多くの場合には、インテイン可動性に関与するエンドヌクレアーゼドメインを含有する(Perler,F.B.,Davis,E.O.,Dean,G.E.,Gimble,F.S.,Jack,W.E.,Neff,N.,Noren,C.J.,Thomer,J.,Belfort,M.Nucleic Acids Research 1994,22,1127-1127)。しかしながら、もたらされるタンパク質は連結されており、別個のタンパク質としては発現されない。タンパク質スプライシングは、別個のポリペプチド上で発現される分裂インテインによって、トランスでもまた行われ得る。これらは自発的に組み合わさって単一のインテインを形成し、これが次いでタンパク質スプライシングプロセスを経過して別個のタンパク質に連結する。

【０２６４】

タンパク質スプライシングの機序の解明は、インテインに基づく数多の用途へ繋がっている(Comb,et al.,米国特許第5,496,714号; Comb,et al.,米国特許第5,834,247号;Camarero and Muir,J.Amer.Chem.Soc.,121:5597-5598(1999);Chong,et al.,Gene,192:271-281(1997),Chong,et al.,Nucleic Acids Res.,26:5109-511

5(1998);Chong,et al.,J.Biol.Chem.,273:10567-10577(1998);Cotton,et al.J.Am.Chem.Soc.,121:1100-1101(1999);Evans,et al.,J.Biol.Chem.,274:18359-18363(1999);Evans,et al.,J.Biol.Chem.,274:3923-3926(1999);Evans,et al.,Protein Sci.,7:2256-2264(1998);Evans,et al.,J.Biol.Chem.,275:9091-9094(2000);Iwai and Pluckthun,FEBS Lett.459:166-172(1999);Mathys,et al.,Gene,231:1-13(1999);Mills,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:3543-3548(1998);Muir,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:6705-6710(1998);Otomo,et al.,Biochemistry 38:16040-16044(1999);Otomo,et al.,J.Biolmol.NMR 14:105-114(1999);Scott,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:13638-13643(1999);Severinov and Muir,J.Biol.Chem.,273:16205-16209(1998);Shingledecker,et al.,Gene,207:187-195(1998);Southworth,et al.,EMBO J.17:918-926(1998);Southworth,et al.,Biotechniques,27:110-120(1999);Wood,et al.,Nat.Biotechnol.,17:889-892(1999);Wu,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:9226-9231(1998a);Wu,et al.,Biochim Biophys Acta 1387:422-432(1998b);Xu,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:388-393(1999);Yamazaki,et al.,J.Am.Chem.Soc.,120:5591-5592(1998))。各参照文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【０２６５】

リガンド依存性インテイン

本願において用いられる用語「リガンド依存性インテイン」は、リガンド結合ドメインを含むインテインを言う。典型的には、リガンド結合ドメインはインテインのアミノ酸配列上に挿入され、構造インテイン(N)-リガンド結合ドメイン-インテイン(C)をもたらす。典型的には、リガンド依存性インテインは、適当なリガンドの不在下においてはタンパク質スプライシング活性を発揮しないかまたは最小限のみ発揮し、リガンドの存在下においてはタンパク質スプライシング活性の顕著な増大を発揮する。いくつかの態様では、リガンド依存性インテインはリガンドの不在下においては観察可能なスプライシング活性を発揮しないが、リガンドの存在下においてはスプライシング活性を発揮する。いくつかの態様では、リガンド依存性インテインはリガンドの不在下においては観察可能なタンパク質スプライシング活性を、適当なリガンド存在下においては、リガンドの不在下において観察される活性よりも少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも1500倍、少なくとも2000倍、少なくとも2500倍、少なくとも5000倍、少なくとも10000倍、少なくとも20000倍、少なくとも25000倍、少なくとも50000倍、少なくとも100000倍、少なくとも500000倍、または少なくとも1000000倍多大であるタンパク質スプライシング活性を発揮する。いくつかの態様では、活性の増大は少なくとも1桁、少なくとも2桁、少なくとも3桁、少なくとも4桁、または少なくとも5桁に渡って用量依存的であり、リガンドの濃度を調整することによってインテイン活性の微調整を許す。好適なリガンド依存性インテインは当該技術分野において知られており、下で提供されるものおよび公開米国特許出願第U.S.2014/0065711A1号;Mootz et al.,"Protein splicng triggered by a small molecule."J.Am.Chem.Soc.2002;124,9044-9045;Mootz et al.,"Conditional protein splicng: a new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo."J.Am.Chem.Soc.2003;125,10561-10569;Buskirk et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 2004;101,10505-10510);Skretas & Wood,"Regulation of protein activity with small-molecule-controlled inteins."Protein Sci.2005;14,523-532;Schwartz,et al.,"Post-translational enzyme activation in an animal via optimized conditional protein splicing."Nat.Chem.Biol.2007;3,50-54;Peck et al.,Chem.Biol.2011;18(5),619-630に記載されているものを包含する;夫々の内容全体は参照によってここに組み込まれる。例示の配列は次のとおりである:

【表２－１】

名称	リガンド依存性インテインの配列
2-4 インテイン:	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVV HNC（配列番号8）
3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYTNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC（配列番号9）
30R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号10）
30R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV

【表２－２】

	YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号11）
30R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号12）
37R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYNPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号13）
37R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号14）
37R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC（配列番号15）

【０２６６】

リンカー

本願において用いられる用語「リンカー」は、２つの他の分子または部分を連結するある分子を言う。リンカーは、２つの融合タンパク質を連結するリンカーのケースで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連結するケースではヌクレオチド配列でもまたあり得る。例えば、本ケースでは、従来のガイドRNAは、スペーサーまたはリンカーヌクレオチド配列を介して、RT鋳型配列とRTプライマー結合部位とを含み得る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。いくつかの態様では、リンカーは、長さが5-100アミノ酸、例えば長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～150、または150～200アミノ酸である。より長いまたはより短いリンカーもまた企図される。

【０２６７】

単離された

「単離された」は、自然状態から変更または除去されることを意味する。例えば、生きている動物中に天然に存在する核20酸またはペプチドは「単離され」ていないが、共存材料のその自然状態から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは、「単離され」ている。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在し得るか、または非ネイティブ(non-native)的環境(例えば、宿主細胞など)で存在し得る。

【０２６８】

いくつかの態様において、着目する遺伝子は、単離された核酸によってコードされる。本明細書に使用されるとき、用語「単離された」は、その元のまたはネイティブ(native)の環境(例として、天然に存在する場合は自然環境)から除去されている、本明細書に提供されるとおりの材料の特徴を指す。したがって、生きている動物中に存在する、天然に存在するポリヌクレオチドまたはタンパク質もしくはポリペプチドは単離されていないが、ヒトの介入によって自然系中の共存材料のいくつかまたはすべてから分離されている同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。人工材料または改変材料、例えば、本明細書に記載の発現コンストラクトおよびベクターなどの、天然には存在しない核酸構築物はまた、結果的に、単離されたとも称される。材料は、単離されるために精製される必要はない。結果的に、材料はベクターの一部および/または組成物の一部であってもよく、かかるベクターまたは組成物が、材料が自然界から見出される環境の一部にない点で、依然単離されている。

【０２６９】

<u>ＭＳ２タグ付け技術</u>

種々の態様では(例えば、図72～73および例19の態様に図示されているとおり)、用語「MS2タグ付け技術」は、RNA-タンパク質相互作用ドメイン、例えば特定のヘアピン構造を特異的に認識および結合するRNA結合タンパク質とペアリングされた「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またはタンパク質」としてもまた公知)の組み合わせを言う。これらの型のシステムは、標的部位に結合されているプライム編集因子複合体に種々の機能性を動員するように活用され得る。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。プライム編集のケースでは、MS2タグ付け技術は、プライム編集に関わる所望のRNA分子(例えば、PEgRNAまたはtPERT)上にMS2ヘアピンを導入することを含む。これは、次いで、その構造を認識および結合するRNA結合タンパク質にとっての特異的な相互作用可能な結合標的を構成する。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。そして、MCPが別のタンパク質(例えば、逆転写酵素または他のDNAポリメラーゼ)に融合される場合には、MS2ヘアピンが、プライム編集複合体によって占有される標的部位にその他のタンパク質をトランスで「動員」するために用いられ得る。

【０２７０】

本明細書に記載のプライム編集因子は、側面として、目当ての特定の機能をプライム編集因子複合体に動員または「共局在」させるためにいずれかの公知のRNA-タンパク質相互作用ドメインを組み込み得る。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、当該技術分野において、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(これら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。他の系も、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。

【０２７１】

MS2ヘアピン(即ち、「MS2アプタマー」と称される)のヌクレオチド配列は以下:GCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCC(配列番号763)である。

【０２７２】

MCPまたはMS2cpのアミノ酸配列は以下:GSASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKVATQTVGGEELPVAGWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANSGIY(配列番号764)である。

【０２７３】

MS2ヘアピン(または「MS2アプタマー」)は、ある型の「RNAエフェクター動員ドメイン」(または同等に「RNA結合タンパク質動員ドメイン」もしくは単純に「動員ドメイン」)ともまた言われ得る。なぜなら、それは、PEgRNAまたはtPERT上に組み入れされる物理的構造(例えばヘアピン)であり、これはそのように改変されたPEgRNAまたはrPERTに他のエフェクター機能(例えば、種々の機能を有するRNA結合タンパク質、例えばDNAポリメラーゼ、または他のDNA修飾酵素)を有効に動員し、それゆえにプライム編集機構にエフェクター機能をトランスで共局在させるからである。この適用は、いずれかの具体的なRNAエフェクター動員ドメインに限定されることを決して意図されず、MS2ヘアピンを包含するいずれかの利用可能なかかるドメインを包含し得る。例19および図72(b)は、標的DNA部位に結合したプライム編集因子複合体(MS2cp-PE2:sgRNA複合体)とtPERT分子のDNA合成ドメインとの共局在が成就することを引き起こすための、DNA合成ドメイン(すなわちtPERT分子)に連結されたMS2アプタマーとPE2に融合されたMS2cpタンパク質を含むプライム編集因子との使用を図示する。

【０２７４】

napDNAbp

本明細書に使用されるとき、用語「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)は、DNA分子中の特定の配列を標的にし結合するために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、ガイド核酸またはこの一部(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配列へnapDNAbpを局在化する、少なくとも1のガイド核酸(例として、ガイドRNA)に結び付けられている。換言すれば、ガイド核酸は、相補的な配列へ局在化し結合するようnapDNAbp(例として、Cas9または等価物)を「プログラム」する。

【０２７５】

理論に拘泥されないが、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ループを形成する(これによってnapDNAbpによって結合された領域中の鎖が分離される)ステップを包含する。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、このことによってRループの単鎖領域が形成される。いくつかの態様において、napDNAbpは1以上のヌクレアーゼ活性を包含しており、次いでDNAを切ることで、様々な型の病変がなくなる。例えば、napDNAbpは、非標的鎖を第1の場所にて切るか、および/または標的鎖を第2の場所にて切る、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が切られることで、両鎖とも切られた「二本鎖切断」が形成され得る。他の態様において、標的DNAは単一の部位でしか切られ得ない、すなわち、DNAは一方の鎖上に「ニックが入れられる(nicked)」。種々のヌクレアーゼ活性をもつ例示のnapDNAbpは、「Cas9ニッカーゼ」(「nCas9」)、およびヌクレアーゼ活性を一切有さない不活性化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への例示の配列は、本明細書に提供されている。

【０２７６】
ニッカーゼ
用語「ニッカーゼ」は、不活性化された2つのヌクレアーゼドメインのうち1つをもつ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。
【０２７７】
核局在化配列(NLS)
用語「核局在化配列」または「NLS」は、タンパク質の細胞核中への、例えば核輸送による、輸入(import)を促進するアミノ酸配列を指す。核局在化配列は当該技術分野において知られており、当業者に明らかであろう。例えば、NLS配列は、2000年11月23日に出願され、2001年5月31日にWO/2001/038547として公開された、Plankらの国際PCT出願PCT/EP2000/011690に記載されている(この内容は、例示の核局在化配列のその開示について参照により本明細書に組み込まれる)。いくつかの態様において、NLSは、アミノ酸配列PKKKRKV(配列番号16)またはMDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号17)を含む。
【０２７８】
核酸分子
用語「核酸」は、本明細書に使用されるとき、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ブロモウリジン、C5フルオロウリジン、C5ヨードウリジン、C5プロピニルウリジン、C5プロピニルシチジン、C5メチルシチジン、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)、化学修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基(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、修飾された糖(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)、または修飾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。
【０２７９】
PEgRNA
本明細書に使用されるとき、用語「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」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以上の追加の配列を包含するよう修飾されたガイドRNAの特化された形態を指す。本明細書に記載のとおり、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、これらに限定されないが、単鎖のRNAまたはDNAを含んでいてもよい。さらに、伸長された領域は、既存のガイドRNAの3'末にて生じていてもよい。他の配置において、伸長された領域は、既存のガイドRNAの5’末にて生じていてもよい。また他の配置において、伸長された領域は、既存のガイドRNAの末端の分子内のある領域にて(例えば、napDNAbpへ結び付きおよび/または結合するgRNAコア領域中)生じていてもよい。伸長された領域は、単鎖DNAを(プライム編集因子のポリメラーゼによって)コードする「DNA合成鋳型」を含むが、前記分子は次に(a)編集されるべき内生標的DNAと相同であるようデザインされており、および(b)内生標的DNA中へ誘導または取り入れられるべき少なくとも1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、もしくは挿入)を含んでいる。伸長された領域はまた、他の機能的配列要素(これらに限定されないが、「プライマー結合部位」および「スペーサーもしくはリンカー」配列など)、または他の構造的要素(これらに限定されないが、アプタマー、ステムループ、ヘアピン、トウループ(例として、3'トウルー

プ)、もしくはRNA-タンパク質動員ドメイン(例として、MS2ヘアピン))も含んでいてもよい。本明細書に使用されるとき「プライマー結合部位」は、Rループのニック入りDNAから生成された3'末を有する単鎖DNA配列とハイブリダイズする配列を含む。

【０２８０】

ある態様において、PEgRNAは、5'伸長アーム、スペーサー、およびgRNAコアを有するPEgRNAを示す図3Aによって表されている。5'伸長は、5'→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。示されているとおり、逆転写酵素鋳型はより幅広く「DNA合成鋳型」ともまた言われ得、ここで、本明細書に記載のプライム編集因子のポリメラーゼはRTではなく別の型のポリメラーゼである。

【０２８１】

ある他の態様において、PEgRNAは、3'伸長アーム、スペーサー、およびgRNAコアを有するPEgRNAを示す図3Bによって表されている。3'伸長は、5'→3'方向に逆転写酵素鋳型、プライマー結合部位をさらに含む。示されているとおり、逆転写酵素鋳型はより幅広く「DNA合成鋳型」ともまた言われ得、ここで、本明細書に記載のプライム編集因子のポリメラーゼはRTではなく別の型のポリメラーゼである。

【０２８２】

更なる他の態様において、PEgRNAは、5'→3'方向にスペーサー(1)、gRNAコア(2)、および伸長アーム(3)を有するPEgRNAを示す図3Dによって表されている。伸長アーム(3)は、PEgRNAの3'末にある。伸長アーム(3)は、5'→3'方向に「プライマー結合部位」(A)、「編集鋳型」(B)、および「相同アーム」(C)をさらに含む。伸長アーム(3)はまた、3'末および5'末にて、同じ配列であってもまたは異なる配列であってもよい任意の修飾領域も含んでいてもよい。加えて、PEgRNAの3'末は、転写ターミネータ配列を含んでいてもよい。PEgRNAのこれらの配列要素はさらに、本明細書に記載、定義される。

【０２８３】

なお他の態様において、PEgRNAは図3Eによって表され、これは5'→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PEgRNAを示す。伸長アーム(3)はPEgRNAの5'端にある。伸長アーム(3)はさらに3'→5'方向に「プライマー結合部位」(A)、「編集鋳型」(B)、および「相同アーム」(C)を含む。伸長アーム(3)は任意の修飾領域をもまた3'および5'端に含み得、これらは同じ配列または異なる配列であり得る。PEgRNAの3'末は、転写ターミネータ配列を含んでいてもよい。PEgRNAのこれらの配列要素はさらに、本明細書に記載、定義される。

【０２８４】

PE1

本願において用いられる「PE1」は、次の構造を有するCas9(H840A)と野生型MMLV RTとを含む融合タンパク質を含むPE複合体を言う:[NLS]-[Cas9(H840A)]-[リンカー]-[MMLV_RT(wt)]+所望のPEgRNA。PE融合体は配列番号123のアミノ酸配列を有し、これは次のとおり示される;

【化１－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN
TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD
LAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
ILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV
TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPV
ENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNK
VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL
SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLV
SDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD
VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF
LYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV
LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT
LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTL
NIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQY
PMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVED
IHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT
WTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALL
QTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREF
LGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTK
PFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAG
KLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLL
PLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTET
EVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSE

【化１－２】

GKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTS
TLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (配列番号 123)

凡例：

核局在化配列 (NLS)最上列:(配列番号 124), 最下列 :
(配列番号 133)
CAS9(H840A) (配列番号 126)
33 アミノ酸リンカー (配列番号 127)
M-MLV 逆転写酵素 (配列番号 128).

【０２８５】

PE2

本願において用いられる「PE2」は、次の構造を有するCas9(H840A)とバリアント

ＭＭＬＶ ＲＴとを含む融合タンパク質を含むＰＥ複合体を言う:[ＮＬＳ]-[Ｃａｓ９(Ｈ８４０Ａ)]-[リンカー]-[ＭＭＬＶ_ＲＴ(Ｄ２００Ｎ)(Ｔ３３０Ｐ)(Ｌ６０３Ｗ)(Ｔ３０６Ｋ)(Ｗ３１３Ｆ)]+所望のＰＥｇＲＮＡ。ＰＥ融合体は配列番号１３４のアミノ酸配列を有し、これは次のとおり示される:

【化２－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGN
TDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTD
KADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPIN
ASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD
LAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGG
ASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHA
ILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW
NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYV
TEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVE
DRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNF
MQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELV
KVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPV
ENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNK
VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGL
SELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLV
SDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYD
VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIV
WDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW
DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF
LYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKV
LSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDAT
LIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTL
NIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQY
PMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVED
IHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLT
WTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALL

【化２－２】

QTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREF
LGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTK
PFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAG
KLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLL
PLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTET
EVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTS
EGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDT
*STLLIENSSP*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV (配列番号 134)

凡例：

核局在化配列 (NLS) 最上列:(配列番号 124), 最下列 : (配列番号 133)

CAS9(H840A) (配列番号 137)

33 アミノ酸リンカー (配列番号 127)

M-MLV 逆転写酵素 (配列番号 139).

【０２８６】

PE3

本願において用いられる「PE3」は、PE2、プラスPE2と複合体化する第2鎖ニッキングガイドRNAを言い、編集される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。

【０２８７】

PE3b

本願において用いられる「PE3b」はPE3を言うが、第2鎖ニッキングガイドRNAは、所望の編集の組み入れ後までは第2鎖ニックが導入されないようにして時間的コントロールのためにデザインされる。これは、元のアレルではなく編集された鎖のみにマッチするスペーサー配列を有するgRNAをデザインすることによって達成される。以降ではPE3bと言われるこの戦略を用いると、プロトスペーサーと編集されないアレルとの間のミスマッチは、PAM鎖上の編集イベントが生起する後までは、sgRNAによるニッキングを好まないはずである。

【０２８８】

短いPE(PE-short)

本願において用いられる「短いPE」は、C末端短縮逆転写酵素に融合されているPE構築物を言い、次のアミノ酸配列を有する:

【化３－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLG**
NTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMA
KVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST
DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPI
NASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT
EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYID
GGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETI
TPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKV
KYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIS

【化３－２】

GVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL
KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKV
VDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQIL
KEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKD
DSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI
TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET
NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKL
IARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELA
LPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVIL
ADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYT
STKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD<u>**SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESS**
<u>**GGSSGGSS**</u>*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPL*
KATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQ
DLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEL
DCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPT
PKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLT
APALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRM
VAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQF
GPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDNSRLIN<u>SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV</u>（配列番号765）

凡例：

<u>核局在化配列</u>（NLS）最上列:（配列番号 124），最下列：（配列番号 133）

CAS9(H840A)（配列番号 157）

33 <u>アミノ酸リンカー1</u>（配列番号 127）

M-MLV トランケートされた逆転写酵素（配列番号 766）

【０２８９】

<u>ペプチドタグ</u>

用語「ペプチドタグ」は、遺伝子学的にタンパク質配列と融合してタンパク質上へ1以上の機能を付与するペプチドアミノ酸配列を指し、これによって可視化、精製、可溶化、分離等々などの様々な目的でのタンパク質の操作が容易になる。ペプチドタグは、目的または機能によって分類される様々な型のタグを包含し得、これは、「親和性タグ」(タンパク質精製を容易にするための)、「可溶化タグ」(タンパク質の正しい折り畳みを補助するための)、「クロマトグラフィータグ」(タンパク質のクロマトグラフ特性を変更するための)、「エピトープタグ」(高親和性抗体へ結合するための)、「蛍光タグ」(細胞中またはin vitroでのタンパク質の可視化を容易にするための)を包含していてもよい。

【０２９０】

<u>ポリメラーゼ</u>

本願において用いられる用語「ポリメラーゼ」は、本明細書に記載のプライム編集因子システムに関して用いられ得るヌクレオチド鎖を合成する酵素を言う。ポリメラーゼは「鋳型依存性」ポリメラーゼであり得る(すなわち、鋳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「鋳型非依存性」ポリメラーゼでもまたあり得る(すなわち、鋳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)。ポリメラーゼはさらに「DNAポリメラーゼ」または「RNAポリメラーゼ」

としてもまた類別され得る。種々の態様において、プライム編集因子システムはDNAポリメラーゼを含む。種々の態様において、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)。かかるケースでは、DNA鋳型分子はPEgRNAであり得、伸長アームはDNAの鎖を含む。かかるケースでは、PEgRNAはキメラまたはハイブリッドPEgRNAと言われ得、これはRNA部分(すなわち、スペーサーおよびgRNAコアを包含するガイドRNA構成要素)とDNA部分(すなわち伸長アーム)とを含む。種々の他の態様において、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)。かかるケースでは、PEgRNAはRNAであり、すなわちRNA伸長を包含する。用語「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドの重合を触媒する酵素をもまた言い得る(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リングしたプライマー(例えば、例えばPEgRNAのプライマー結合部位にアニーリングしたプライマー配列)の3'端において合成を開始し、鋳型鎖の5'端の方へ進むであろう。「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願において用いられる用語DNAポリメラーゼは、「その機能的フラグメント」を包含する。「その機能的フラグメント」は、少なくとも1つのセットの条件下においてはポリヌクレオチドの重合を触媒する能力を保持する、ポリメラーゼのアミノ酸配列全体未満を包摂する野生型または変異体DNAポリメラーゼのいずれかの部分を言う。かかる機能的フラグメントは別個の実態として存在し得るか、またはそれ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成分であり得る。

【０２９１】

<u>プライム編集および多重フラッププライム編集因</u>

本願において用いられる用語「プライム編集」または「古典的プライム編集」は、遺伝子編集のための新規のアプローチを言い、napDNAbp、ポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)、および次いで標的DNA配列上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化したガイドRNAを用いる。プライム編集のある種の態様は他の図の中でも図1A～1Hおよび図72(a)～72(c)の態様に記載される。古典的プライム編集は、Anzalone,A.V.et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA.Nature 576,149-157(2019)(これ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)という本発明者らの刊行物に記載される。

【０２９２】

プライム編集は、規定されたDNA部位に新たな遺伝情報を直接的に書き込む汎用的な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ホームを表し、ポリメラーゼ(すなわち、融合タンパク質の形態で、またはさもなければnapDNAbpとトランスで提供されて)と共同で働く核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を用いる。プライム編集システムはプライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によってプログラムされ、これは、標的部位を規定すると共に、ガイドRNA上に(例えば、ガイドRNAの5'もしくは3'端にまたは内部の部分に)操作された伸長(DNAまたはRNAどちらか)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(例えば、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(ニック部位の直ちに下流の)内生鎖と同じ配列を共有する(またはそれに対して相同的である)(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生鎖は、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。いくつかのケースでは、プライム編集は「検索置換」ゲノム編集テクノロジーと考えられ得る。なぜなら、本明細書に記載のプライム編集因子は、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生DNA鎖の代わりに組み入れ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。本開示のプライム編集因子は、部分的には、プライム標的にプライムされた逆転写(TPRT)または「プライム編集」の機序が、高い効率および遺伝子フレキシビリティーを有す

る精密なCRISPR/Casに基づく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(例えば、図1A-1Fの種々の態様に図示されているとおり)。天然には、TPRTは、可動DNAエレメント、例えば哺乳類非LTRレトロトランスポゾンおよび細菌グループIIイントロンによって用いられる[28,29]。本発明者らは、本願において、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用いて、ガイドRNAによって特定の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に取り入れされた操作された逆転写酵素鋳型の逆転写のためのプライマーとして、ニッキングされたDNAを用いた。しかしながら、概念はDNAポリメラーゼ構成要素として逆転写酵素を用いるプライム編集因子から始まるが、本明細書に記載のプライム編集因子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得る。実に、本願は、至る所で、「逆転写酵素」を有するプライム編集因子を言い得るが、逆転写酵素は、プライム編集で働き得るDNAポリメラーゼの1つの型であるのみであるということがここで明示される。それゆえに、本明細書が「逆転写酵素」に言及するところではいつも、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用いられ得るということを了解するべきである。それゆえに、一側面において、プライム編集因子はCas9(または同等のnapDNAbp)を含み得、これは、標的DNA上の相補的なプロトスペーサーにアニールするスペーサー配列を含有する特殊化したガイド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。特殊化したガイドRNAは、所望の遺伝子変改を含有する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をもまた含有し、これは、標的部位における対応する内生DNA鎖を置き換えるために用いられる。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には、DNAの1つの鎖上の標的部位へニックを入れて3'ヒドロキシル基を暴露することが関わる。次いで、暴露された3'ヒドロキシル基は、直接的に標的部位へのPEgRNA上の編集をコードする伸長のDNA重合をプライムするために用いられ得る。種々の態様において、編集を含有する置き換え鎖の重合のための鋳型を提供する伸長は、RNAまたはDNAから形成され得る。RNA伸長のケースでは、プライム編集因子のポリメラーゼはRNA依存性DNAポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)であり得る。DNA伸長のケースでは、プライム編集因子のポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得る。本明細書に開示のプライム編集因子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(例えば、1ヌクレオチド変化、欠失、もしくは挿入、またはそれらの組み合わせ)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フラップともまた言われ得る。これは相補的な相同的な内生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生鎖に取って代わるであろう。ある態様において、システムは、エラーを起こしやすい逆転写酵素酵素の使用と組み合わせられ得る(例えば、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酵素は一本鎖DNAフラップの合成の間に変改を導入し得る。それゆえに、ある態様において、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。システムに用いら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(内生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、内生DNAのもたらされる取って代わられたフラップの除去(例えば、5'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。鋳型による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ヌクレオチド精度をオファーするので、このアプローチの範囲は非常に幅広く、予見可能には、基礎研究および治療学において無数の適用に用いられ得る。

【０２９３】

種々の態様において、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。図1Gを参照すると、プライム編集ガイドRNA(PEgRNA)は、ガイドRNAの3'もしくは5'端にまたはガイドRNAの分子内の位置付けに伸長を含み、所望のヌクレオチド変化(例えば、1ヌクレオチド変化、挿入、または欠失)をコードする。ステップ(a)では、napDNAbp/伸長されたgRNA複合体がDNA分子に接触し、伸長されたgRNAが、標的遺伝子座に結合するようにnapDNAbpをガイドする。ステップ(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(例えば、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'端を標的遺伝子座の鎖の1つに生出する。ある態様において、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」上に生出される。しかしながら、ニックは鎖のどちらかに導入され得る。つまり、ニックはRループ「標的鎖」(すなわち、伸長されたgRNAのプロトスペーサーにハイブリダイズされる鎖)または「非標的鎖」(すなわち、標的鎖に対して相補的であるRループの一本鎖部分を形成する鎖)に導入され得る。ステップ(c)では、DNA鎖の3'端(ニックによって形成される)は、逆転写をプライムするためにガイドRNAの伸長された部分と相互作用する(すなわち、「プライム標的にプライムされたRT」)。ある態様において、3'端DNA鎖は、ガイドRNAの伸長された部分の特異的なRTプライム配列、すなわちPEgRNA上の「逆転写酵素プライム配列」または「プライマー結合部位」にハイブリダイズする。ステップ(d)では、逆転写酵素(または他の好適なDNAポリメラーゼ)が導入される。これは、プライムされた部位の3'端からプライム編集ガイドRNAの5'端の方へDNAの一本鎖を合成する。DNAポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)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生DNAに対してさもなければ相同的である所望のヌクレオチド変化(例えば、1塩基変化、挿入、もしくは欠失、またはそれらの組み合わせ)を含む一本鎖DNAフラップを形成する。ステップ(e)では、napDNAbpおよびガイドRNAがリリースされる。ステップ(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、ひとたび3'一本鎖DNAフラップが内生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'内生DNAフラップを除去することによって、所望の産物形成の方へ駆動され得る。理論によって拘束されることなしに、細胞の内生DNA修復および複製プロセスは、ミスマッチのDNAを分解して、ヌクレオチド変化(単数または複数)を組み込んで、所望の変改された産物を形成する。プロセスは、図1Fに例示されているとおり「第2鎖ニッキング」によってもまた産物形成の方へ駆動され得る。このプロセスは次の遺伝子変化の少なくとも1以上を導入し得る:トランスバージョン、トランジション、欠失、および挿入。

【０２９４】

用語「プライム編集因子(PE)システム」または「プライム編集因子(PE)」または「PEシステム」または「PE編集システム」は、本明細書に記載の(describe)プライム標的にプライムされた逆転写(TPRT)を用いるゲノム編集の方法に関わる組成物を言い、napDNAbp、逆転写酵素、融合タンパク質(例えば、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、ならびに補助的な要素、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鎖ニッキング構成要素(例えば、第2鎖sgRNA)および5'内生DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼ(例えばFEN1)を包含するが、これらに限定されない。

【０２９５】

ここまで記載された態様では、PEgRNAは、ガイドRNA(これは、それ自体が、スペーサー配列およびgRNAコアまたは骨格を含む)とプライマー結合部位およびDNA合成鋳型を含む5'または3'伸長アームとを含む単一分子を構成するが(例えば図3Dを見よ)、PEg

RNAは2つの個々の分子の形態をもまた取り得、ガイドRNAと、トランスプライム編集因子RNA鋳型(tPERT)とからなる。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(例えば、MS2アプタマーまたはヘアピン)を同じ分子上に収容する。これは、tPERT動員タンパク質(例えば、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編集因子複合体へと共局在または動員されるようになる。プライム編集に用いられ得るtPERTの例としては図3Gおよび図3Hを見よ。

【０２９６】

「二重フラッププライム編集システム」では、2つのpegRNAが用いられて、ゲノム部位の対向する鎖を標的化し、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図91)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、二重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットするプライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。

【０２９７】

古典的プライム編集のように、多重フラッププライム編集(二重フラップおよび四重フラッププライム編集を包含する)は多目的のかつ正確なゲノム編集方法である。これは、ポリメラーゼ(すなわち、napDNAbpとの融合タンパク質の形態の、または別様にトランスで提供される)と関連して働く核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を用いて、規定されたDNA部位に新たな遺伝情報を直接的に書き込み、プライム編集システムは、プライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によってプログラムされる。これは、ガイドRNA上に(例えば、5'もしくは3'端に、またはガイドRNAの内部部分に)操作された伸長(DNAまたはRNAどちらか)によって、標的部位を規定することおよび置き換えDNA鎖の形態の所望の編集の合成の鋳型となること両方をする。所望の編集(例えば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内生鎖と同じ配列を共有する(それが所望の編集を包含することを例外とする)。DNA修復および/または複製機構によって、標的部位の内生鎖は、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。いくつかのケースでは、プライム編集は「探索-と-置き換え」ゲノム編集テクノロジーと考えられ得る。なぜなら、本願に記載されるプライム編集因子は編集されるべき所望の標的部位を探索し位置付けるのみならず、同時に、所望の編集を含有する置き換え鎖をコードし、これが、対応する標的部位の内生DNA鎖に代えて組み入れられるからである。

【０２９８】

<u>プライム編集因子</u>

本明細書に記載の二重プライム編集システムはプライム編集因子のペアを含む。用語「プライム編集因子」は、napDNAbp(例として、Cas9ニッカーゼ)および逆転写酵素を含む本明細書に記載の融合構築物を指し、PEgRNA(または「伸長されたガイドRNA」)の存在下で標的ヌクレオチド配列上にプライム編集を遂行することが可能である。用語「プライム編集因子」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鎖ヘニックを入れる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。いくつかの態様において、プライム編集因子はまた、本明細書に記載のとおりの非編集済鎖の第2部位へのニック入れステップ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、および定例の(regular)ガイドRNAを含む複合体も指してもよい。他の態様において、「プライマー編集因子」の逆転写酵素構成要素は、transで提供されてもよい。

【０２９９】

本願に記載される二重フラッププライム編集システムはプライム編集因子のペアを含む。本願に記載される四重フラッププライム編集システムは4つのプライム編集因子を含む。

【０３００】

プライマー結合部位

用語「プライマー結合部位」または「PBS」は、伸長アームの構成要素としてPEgRNA上に位置付けられ(典型的には伸長アームの3'末にある)ヌクレオチド配列であって、プライム編集因子による標的配列のCas9ニック入れ後に形成されるプライマー配列へ結合するのに役立つヌクレオチド配列を指す。他のどこかで詳述されるとおり、プライム編集因子のCas9ニッカーゼ構成要素が標的DNA配列の鎖の一方にニックを入れたとき、3'末の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とアニールして逆転写をプライムするプライマー配列として働く。

【０３０１】

プロモーター

用語「プロモーター」は当該技術分野において認識されており、細胞性の転写機構によって認識され、下流遺伝子の転写を開始する能力がある配列を有する核酸分子を言う。プロモーターは、プロモーターが所与の細胞性という文脈において常に活性であるということを意味する恒常的に活性、またはプロモーターが特定の条件の存在下においてのみ活性であるということを意味する条件付きで活性であり得る。例えば、条件付きプロモーターは、プロモーター上の制御エレメントと会合したタンパク質を基本的な転写機構に接続する特定のタンパク質の存在下においてのみ、または阻害分子の不在下においてのみ活性であり得る。条件付きで活性なプロモーターのサブクラスは、活性のために低分子「誘導因子」の存在を要求する誘導性プロモーターである。誘導性プロモーターの例は、アラビノース誘導性プロモーター、Tet-onプロモーター、およびタモキシフェン誘導性プロモーターを包含するが、これらに限定されない。種々の恒常的、条件付き、および誘導性プロモーターが当業者に周知であり、当業者は本発明を実行することに有用な種々のかかるプロモーターを確かめる能力があるであろう。これはこの点について限定されない。

【０３０２】

プロトスペーサー

本願において用いられる用語「プロトスペーサー」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(～20bp)を言う。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、それの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」)にアニールする。Cas9が機能するためには、それは特定のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)をもまた要求し、これはCas9遺伝子の細菌種に依存して変わる。S.pyogenesに由来する最も普通に用いられる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出される非標的鎖上のNGGというPAM配列を認識する。当業者は、現況技術の文献が、場合によっては、それを「スペーサー」と言うよりもむしろ、ガイドRNAそれ自体の上の～20nt標的特異的ガイド配列として「プロトスペーサー」を言うということを了解するであろう。それゆえに、いくつかのケースでは、本願において用いられる用語「プロトスペーサー」は用語「スペーサー」と交換可能に用いられ得る。「プロトスペーサー」または「スペーサー」どちら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。

【０３０３】

プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)

本願において用いられる用語「プロトスペーサー隣接配列」または「PAM」は、Cas9ヌクレアーゼの重要な標的化構成要素であるおよそ2-6塩基対のDNA配列を言う。典型的には、PAM配列はどちらかの鎖上にあり、Cas9によってカットされる部位の5'→3'方向においては下流である。標準的なPAM配列(すなわち、Streptococcus pyogenesのCas9ヌクレアーゼまたはSpCas9に関連するPAM配列)は5'-NGG-3'であり、「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し得る。加えて、いずれかの所与のCas9ヌクレアーゼ、例えば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特異性を変改するように改変され得る。

【０３０４】

例えば、配列番号18の(is)標準的なSpCas9アミノ酸配列を参照して、PAM配列は1以上の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へと変改するD1135V、R1335Q、およびT1337R「VQRバリアント」、(b)PAM特異性をNGAGへと変改するD1135E、R1335Q、およびT1337R「EQRバリアント」、ならびに(c)PAM特異性をNGCGへと変改するD1135V、G1218R、R1335E、およびT1337R「VRERバリアント」を包含する。加えて、標準的なSpCas9のD1135Eバリアントはなおを認識するが、それは野生型SpCas9タンパク質と比較して選択的である。

【０３０５】

異なる細菌種からのCas9酵素(すなわち、Cas9オーソログ)は様々なPAM特異性を有し得るということもまた了解されるであろう。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されない。さらに、非SpCas9が種々のPAM配列に結合するということは了解されるであろう。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ときにそれらを有用にする。さらにその上、非SpCas9は、それらをSpCas9よりも有用にする他の特徴を有し得る。例えば、Staphylococcus aureusからのCas9(SaCas9)はSpCas9よりも約1キロベース小さい。そのため、それはアデノ随伴ウイルス(AAV)にパッケージングされ得る。Shah et al.,"Protospacer recognition motifs:mixed identities and functional diversity,"RNA Biology,10(5):891-899のさらなる参照がなされ得る(これは参照によって本願に組み込まれる)。

【０３０６】

<u>リコンビナーゼ</u>

本願において用いられる用語「リコンビナーゼ」は、リコンビナーゼ認識配列間のDNAの組み換えを媒介する部位特異的な酵素を言い、これはリコンビナーゼ認識配列間のDNAフラグメントの切除、取り入れ、逆位、または交換(例えば転座)をもたらす。リコンビナーゼは2つの別物のファミリーに分類され得る:セリンリコンビナーゼ(例えばリゾルバーゼおよびインベルターゼ)およびチロシンリコンビナーゼ(例えばインテグラーゼ)である。セリンリコンビナーゼの例は、限定なしに、Hin、Gin、Tn3、β-six、CinH、ParA、γδ、Bxb1、φC31、TP901、TG1、φBT1、R4、φRV1、φFC1、MR11、A118、U153、およびgp29を包含する。チロシンリコンビナーゼの例は、限定なしに、Cre、FLP、R、Lambda、HK101、HK022、およびpSAM2を包含する。セリンおよびチロシンリコンビナーゼの名称は、リコンビナーゼがDNAを攻撃するために用い、鎖交換の間にDNAに共有結合的に連結されるようになる保存された求核性アミノ酸残基から派生する。リコンビナーゼは、遺伝子ノックアウト/ノックインの生出および遺伝子治療適用を包含する数々の適用を有する。例として、Brown et al.,"Serine recombinases as tools for genome engineering."Methods.2011;53(4):372-9;Hirano et al.,"Site-specific recombinases as tools for heterologous gene in

tegration."Appl.Microbiol.Biotechnol.2011;92(2):227-39;Chavez and Calos,"Therapeutic applications of the ΦC31 integrase system."Curr.Gene Ther.2011;11(5):375-81;Turan and Bode,"Site-specific recombinases:from tag-and-target- to tag-and-exchange-based genomic modifications."FASEB J.2011;25(12):4088-107;Venken and Bellen,"Genome-wide manipulations of Drosophila melanogaster with transposons, Flp recombinase, and ΦC31 integrase."Methods Mol.Biol.2012;859:203-28;Murphy,"Phage recombinases and their applications."Adv.Virus Res.2012;83:367-414;Zhang et al.,"Conditional gene manipulation: Cre-ating a new biological era."J.Zhejiang Univ.Sci.B.2012;13(7):511-24;Karpenshif and Bernstein,"From yeast to mammals:recent advances in genetic control of homologous recombination."DNA Repair(Amst).2012;1;11(10):781-8(各々の全内容は、それら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)を参照。本願において提供されるリコンビナーゼは、本発明の態様に用いられ得るリコンビナーゼの専らの例であることを意味されない。本発明の方法および組成物は、新たな直交的なリコンビナーゼについてデータベースをマイニングすることまたは定められたDNA特異性を有する合成リコンビナーゼをデザインすることによって拡張され得る(例として、Groth et al.,"Phage integrases:biology and applications."J.Mol.Biol.2004;335,667-678;Gordley et al.,"Synthesis of programmable integrases."Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.2009;106,5053-5058(各々の全内容は、それら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)を参照)。本明細書に記載の方法および組成物に有用であるリコンビナーゼの他の例は当業者には知られており、発見または生成されるいずれかの新たなリコンビナーゼは、本発明の異なる態様に用いられる能力があることが予想される。いくつかの態様では、リコンビナーゼの触媒ドメインは、ヌクレアーゼを不活性化されたRNAによってプログラム可能なヌクレアーゼ(例えば、dCas9またはそのフラグメント)に融合され、その結果、リコンビナーゼドメインは核酸結合ドメインを含まないかまたは標的核酸に結合する能力がない(例えば、リコンビナーゼドメインはそれが特異的なDNA結合活性を有さないようにして操作される)。DNA結合活性を欠くリコンビナーゼおよび改変するための方法は知られており、Klippel et al.,"Isolation and characterisation of unusual gin mutants."EMBO J.1988;7:3983-3989:Burke et al.,"Activating mutations of Tn3 resolvase marking interfaces important in recombination catalysis and its regulation.Mol Microbiol.2004;51:937-948;Olorunniji et al.,"Synapsis and catalysis by activated Tn3 resolvase mutants."Nucleic Acids Res. 2008;36:7181-7191;Rowland et al.,"Regulatory mutations in Sin recombinase support a structure-based model of the synaptosome."Mol Microbiol.2009;74:282-298;Akopian et al.,"Chimeric recombinases with designed DNA sequence recognition."Proc Natl Acad Sci USA.2003;100:8688-8691;Gordley et al.,"Evolution of programmable zinc finger-recombinases with activity in human cells.J Mol Biol.2007;367:802-813;Gordley et al.,"Synthesis of programmable integrases."Proc Natl Acad Sci USA.2009;106:5053-5058;Arnold et al.,"Mutants of Tn3 resolvase which do not require accessory binding sites for recombination activity."EMBO J.1999;18:1407-1414;Gaj et al.,"Structure-guided reprogramming of serine recombinase DNA sequence specificity."Proc Natl Acad Sci USA.2011;108(2):498-503;およびProudfoot et al.,"Zinc finger recombinases with adaptable DNA sequence specificity."PLoS One.2011;6(4):e19537(各々の全内容は、それら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)によって記載されるものを包含する。例えば、リゾルバーゼ-インベルターゼ群のセリンリコンビナーゼ、例えばTn3およびγδリゾルバーゼならびにHinおよびGinインベルターゼは、自律的な触媒およびDNA結合ドメインを有する分子構造を有する(例として

、Grindley et al.,"Mechanism of site-specific recombination."Ann Rev Biochem.2006;75:567-605(その全内容は参照により組み込まれる)を参照)。それゆえに、例えばいずれかの補助的な因子(例えばDNA結合活性)を要求しない「活性化された」リコンビナーゼ変異体の単離後に、これらのリコンビナーゼの触媒ドメインは、本明細書に記載のとおりヌクレアーゼを不活性化されたRNAによってプログラム可能なヌクレアーゼ(例えば、dCas9またはそのフラグメント)と組み換えられることに対して従順である(例として、Klippel et al.,"Isolation and characterisation of unusual gin mutants."EMBO J.1988;7:3983-3989:Burke et al.,"Activating mutations of Tn3 resolvase marking interfaces important in recombination catalysis and its regulation. Mol Microbiol.2004;51:937-948;Olorunniji et al.,"Synapsis and catalysis by activated Tn3 resolvase mutants."Nucleic Acids Res.2008;36:7181-7191;Rowland et al.,"Regulatory mutations in Sin recombinase support a structure-based model of the synaptosome."Mol Microbiol.2009;74:282-298;Akopian et al.,"Chimeric recombinases with designed DNA sequence recognition."Proc Natl Acad Sci USA.2003;100:8688-8691を参照)。加えて、N末端触媒ドメインおよびC末端DNA結合ドメインを有する多くの他の天然のセリンリコンビナーゼが知られており(例えば、ファイC31インテグラーゼ、TnpXトランスポゼース、IS607トランスポゼース)、それらの触媒ドメインは、本明細書に記載のとおりプログラム可能な部位特異的なリコンビナーゼを操作するために選出され得る(例として、Smith et al.,"Diversity in the serine recombinases."Mol Microbiol.2002;44:299-307(その全内容は参照により組み込まれる)を参照)。類似に、チロシンリコンビナーゼ(例えば、Cre、λインテグラーゼ)のコア触媒ドメインは知られており、本明細書に記載のとおりプログラム可能な部位特異的リコンビナーゼを操作するために類似に選出され得る(例として、Guo et al.,"Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse."Nature.1997;389:40-46;Hartung et al.,"Cre mutants with altered DNA binding properties."J Biol Chem 1998;273:22884-22891;Shaikh et al.,"Chimeras of the Flp and Cre recombinases:Tests of the mode of cleavage by Flp and Cre.J Mol Biol.2000;302:27-48;Rongrong et al.,"Effect of deletion mutation on the recombination activity of Cre recombinase."Acta Biochim Pol.2005;52:541-544;Kilbride et al.,"Determinants of product topology in a hybrid Cre-Tn3 resolvase site-specific recombination system."J Mol Biol.2006;355:185-195;Warren et al.,"A chimeric cre recombinase with regulated directionality."Proc Natl Acad Sci USA.2008 105:18278-18283;Van Duyne,"Teaching Cre to follow directions."Proc Natl Acad Sci USA.2009 Jan 6;106(1):4-5;Numrych et al.,"A comparison of the effects of single-base and triple-base changes in the integrase arm-type binding sites on the site-specific recombination of bacteriophage λ."Nucleic Acids Res.1990;18:3953-3959;Tirumalai et al.,"The recognition of core-type DNA sites by λ integrase."J Mol Biol.1998;279:513-527;Aihara et al.,"A conformational switch controls the DNA cleavage activity of λ integrase."Mol Cell.2003;12:187-198;Biswas et al.,"A structural basis for allosteric control of DNA recombination by λ integrase."Nature.2005;435:1059-1066;およびWarren et al.,"Mutations in the amino-terminal domain of λ-integrase have differential effects on integrative and excisive recombination."Mol Microbiol.2005;55:1104-1112(各々の全内容は参照により組み込まれる)を参照)。

【０３０７】

<u>リコンビナーゼ認識配列</u>

本願において、または「RRS」もしくは「リコンビナーゼ標的配列」もしくは「リコ

ンビナーゼ部位」のように同等に用いられる用語「リコンビナーゼ認識配列」は、リコンビナーゼによって認識され、かつRRSを有する別のDNA分子との鎖交換を経過するヌクレオチド配列標的を言う。これはリコンビナーゼ認識配列間のDNA断片の切除、取り入れ、逆位、または交換をもたらす。種々の態様において、多重鎖プライム編集因子は、標的配列上にまたは1より多くの標的配列上に1以上のリコンビナーゼ部位を組み入れ得る。1より多くのリコンビナーゼ部位が多重鎖プライム編集因子によって組み入れられるときに、リコンビナーゼ部位は隣接標的部位または非隣接標的部位(例えば、別個の染色体)に組み入れられ得る。種々の態様において、単一の組み入れられたリコンビナーゼ部位は、ゲノム上のリコンビナーゼ部位と外来的に供給される核酸分子、例えばプラスミド上の第2のリコンビナーゼ部位との間におけるリコンビナーゼによって媒介される反応のための「着陸地点」として用いられ得る。これは所望の核酸分子の標的化された取り入れを可能化する。他の態様において、2つのリコンビナーゼ部位がDNAの隣接領域(例えば、25～50bp、50～100bp、100～200bp、200～300bp、300～400bp、400～500bp、500～600bp、600～700bp、700～800bp、800～900bp、900～1000bp、1000～2000bp、2000～3000bp、3000～4000bp、4000～5000bp、またはより多くによって分離される)に挿入されるところでは、リコンビナーゼ部位は、介在配列のリコンビナーゼによって媒介される切除もしくは逆位のために、または同じリコンビナーゼ部位を有する外来的なDNAとのリコンビナーゼによって媒介されるカセット交換のために用いられ得る。2以上のリコンビナーゼ部位が2つの異なる染色体上において多重フラッププライム編集因子によって組み入れられるときには、第1の染色体上の位置付けから第2への介在する配列の転座が生起し得る。

【０３０８】

組み換えるまたは組み換え

用語「組み換える」または「組み換え」は、核酸改変(例えばゲノム改変)という文脈において、2以上の核酸分子または単一の核酸分子の2以上の領域がリコンビナーゼタンパク質(例えば、本願において提供される本発明のリコンビナーゼ融合タンパク質)の作用によって改変されるプロセスを言うために用いられる。組み換えは、例えば1以上の核酸分子上または間において、核酸のとりわけ挿入、逆位、切除、または転座をもたらし得る。

【０３０９】

逆転写酵素

用語「逆転写酵素」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を記述する。全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はプライマーを要求する。歴史的には、逆転写酵素は主としてmRNAをcDNAに転写するために用いられている。これは次いでさらなる操作のためにベクター上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指令型DNAポリメラーゼ活性、5'-3'DNA指令型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プ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マウス白血病ウイルス(M-MLV)を起源とする逆転写酵素である。例えば、Gerard, G. R., DNA 5:271-279(1986)およびKotewicz, M. L., et al., Gene 35:249-258(1985)を見よ。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。例えばU.S.Pat.No.5,244,797を見よ。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アントもし

くは変異体の使用を企図する。

【０３１０】

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言われ得る逆転写酵素、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と取り入れされた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、対応する内生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生鎖の除去、ライゲーション、ならびに次いで内生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。

【０３１１】

逆転写

本願において用いられる用語「逆転写」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言う。

【０３１２】

PACE

本願において用いられる用語「ファージによって補助される連続的進化(PACE)」は、ウイルスベクターとしてファージを使用する連続的進化を言う。PACE技術の一般概念は、例えば、2009年9月8日出願の国際PCT出願PCT/US2009/056194、2010年3月11日にWO 2010/028347として公開;2011年12月22日出願の国際PCT出願PCT/US2011/066747、2012年6月28日にWO 2012/088381として公開;米国出願、2015年5月5日に発行された米国特許第9,023,594号;2015年1月20日出願の国際PCT出願PCT/US2015/012022、2015年9月11日にWO 2015/134121として公開;および2016年4月15日出願の国際PCT出願PCT/US2016/027795、2016年10月20日にWO 2016/168631として公開(これら全体の各内容は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。

【０３１３】

ファージ

本願において用語「バクテリオファージ」と交換可能に用いられる用語「ファージ」は、細菌細胞に感染するウイルスを言う。典型的には、ファージは遺伝物質を内包する外側タンパク質カプシドからなる。遺伝物質は直線状または環状形態どちらかのssRNA、dsRNA、ssDNA、またはdsDNAであり得る。ファージおよびファージベクターは当業者には周知であり、本願において提供されるPACE法を実行するために有用であるファージの限定しない例は、λ(溶原体)、T2、T4、T7、T12、R17、M13、MS2、G4、P1、P2、P4、ファイX174、N4、Φ6、およびΦ29である。ある態様において、本発明に利用されるファージはM13である。追加の好適なファージおよびホスト細胞は当業者には明らかであろう。本発明はこの側面において限定されない。追加の好適なファージおよびホスト細胞の例示の記載は、Elizabeth Kutter and Alexander Sulakvelidze:Bacteriophages: Biology and Applications.CRC Press;1st edition(December 2004),ISBN:0849313368;Martha R.J.Clokie and Andrew M.Kropinski:Bacteriophages:Methods and Protocols,Volume 1:Isolation,Characterization,and Interactions(Methods in Molecular Biology)Humana Press;1st edition(December,2008),ISBN:1588296822;Martha R.J.Clokie and Andrew M.Kropinski:Bacteriophages:Methods and Protocols,Volume 2:Molecular and Applied Aspects(Methods in Molecular Biology)Humana Press;1st edition(December 2008),ISBN:1603275649を見よ;これらの全ては、好適なファージおよ

びホスト細胞、ならびにかかるファージの単離、培養、および操作のための方法およびプロトコールの開示について、それらの全体が参照によって本願に組み込まれる)。

【０３１４】

タンパク質、ペプチド、およびポリペプチド

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は本明細書中、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、抱合のためのリンカー、官能基化、または他の修飾等々などの化学的実体(chemical entity)の付加によって修飾されていてもよい。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よく、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フラグメントであってもよい。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、またはいずれのそれらの組み合わせであってもよい。本明細書に提供されるタンパク質のいずれも、当該技術分野において知られているいずれの方法によって産生されてもよい。例えば、本明細書に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とくに適した、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、Green and Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(２０１２)(これらの内容全体は参照により本明細書に組み込まれる))によって記載されるものを包含する。

【０３１５】

タンパク質スプライシング

本願において用いられる用語「タンパク質スプライシング」は、インテイン(または場合に応じて分裂インテイン)の配列がアミノ酸配列内から切り出され、アミノ酸配列の残りのフラグメントのエクステインがアミド結合によってライゲーションされて連続的なアミノ酸配列を形成するプロセスを言う。用語「トランス」タンパク質スプライシングは、インテインが分裂インテインであり、それらが異なるタンパク質上に位置付けられる特定のケースを言う。

【０３１６】

第2鎖ニッキング

プライム編集の結果として形成されるヘテロ二重鎖DNA(すなわち、1つの編集されたおよび1つの非編集の鎖を含有する)の分解は、長期的な編集アウトカムを決定する。言葉にすると、プライム編集のゴールは、相補的な内生鎖上に編集された鎖を永久的に取り入れすることによって、PEの中間体として形成されるヘテロ二重鎖DNA(内生非編集鎖と対形成した編集された鎖)を分解することである。DNA分子上への編集された鎖の永久的な取り入れに有利にヘテロ二重鎖DNAの分解を駆動することを助けるために、「第2鎖ニッキング」のアプローチが本願において用いられ得る。本願において用いられる「第2鎖ニッキング」の概念は、第1のニック(すなわち、ガイドRNAの伸長された部分上の逆転写酵素のプライムへの使用のための遊離の3'端を提供する当初のニック部位)の下流の位置付けにおける、好ましくは編集されない鎖上の第2のニックの導入を言う。ある態様において、第1のニックおよび第2のニックは対向する鎖上にある。他の態様において、第1のニックおよび第2のニックは対向する鎖上にある。さらに別の態様では、第1のニックは非標的鎖(すなわち、Rループの一本鎖部分を形成する鎖)上にあり、第2のニックは標的鎖上にある。なお他の態様において、第1のニックは編集される鎖上にあり、第2のニックは編集されない鎖上にある。第2のニックは、第1のニックの少なくとも5ヌク

レオチド下流に、あるいは第1のニックの少なくとも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、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、もしくは150ヌクレオチド、またはより多く下流に位置取り得る。第2のニックは、ある態様において、編集されない鎖上において、PEgRNAによって誘導されるニックの部位から約5～150ヌクレオチドの間、または約5～140の間、もしくは約5～130の間、もしくは約5～120の間、もしくは約5～110の間、もしくは約5～100の間、もしくは約5～90の間、もしくは約5～80の間、もしくは約5～70の間、もしくは約5～60の間、もしくは約5～50の間、もしくは約5～40の間、もしくは約5～30の間、もしくは約5～20の間、もしくは約5～10の間離れて導入され得る。1つの態様では、第2のニックは、PEgRNAによって誘導されるニックから14～116ヌクレオチドの間離れて導入される。理論によって拘束されることなしに、第2のニックは細胞の内生DNA修復および複製プロセスを編集されない鎖の置き換えまたは編集の方へ誘導し、それによって、両鎖上に編集された配列を永久的に組み入れし、PEの結果として形成されるヘテロ二重鎖を分解する。いくつかの態様では、編集される鎖は非標的鎖であり、編集されない鎖は標的鎖である。他の態様において、編集される鎖は標的鎖であり、編集されない鎖は非標的鎖である。

【０３１７】

センス鎖

遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'へ伸びる二本鎖のDNA内のセグメントであって、3'から5'へ伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に相補的である。タンパク質をコードするDNAセグメントのケースにおいて、センス鎖は、転写の最中にその鋳型としてアンチセンス鎖を取り結局(典型的には、常にではない)翻訳を経てタンパク質になるmRNAと同じ配列を有するDNAの鎖である。よって、アンチセンス鎖は、後にタンパク質へ翻訳されるRNAを担い、一方センス鎖は、mRNAとほぼ同一の組成(makeup)を保有する。dsDNAの各セグメントについて、一方がどの方向から読まれるかに応じて、おそらく(センスおよびアンチセンスは視点に相対するから)センスおよびアンチセンスが2組存在するであろう点に留意する。遺伝子産物またはmRNAは結局、dsDNAの一方のセグメントのどちらかの鎖がセンスまたはアンチセンスと称されることを示す。

【０３１８】

PEgRNAの文脈において、第1ステップは、5'→3'方向に配向される単鎖相補DNA(すなわち、組み込まれることになる3'ssDNAフラップ)の合成であるが、前記合成鎖はPEgRNA伸長アームの鋳型から外れる。3'ssDNAフラップがセンス鎖と見なされるべきかまたはアンチセンス鎖と見なされるべきかについては、DNAの両鎖が転写のための鋳型として働き得る(が同時ではない)ことが十分に許容されているところ、転写の方向に依存する。よって、いくつかの態様において、3'ssDNAフラップ(全体的に5'→3'方向に伸びる)は、コード鎖であることから、センス鎖として働くであろう。他の態様において、3'ssDNAフラップ(全体的に5'→3'方向に伸びる)はアンチセンス鎖として働き、よって転写の鋳型であろう。

【０３１９】

配列相同性

別の配列に対する「相同的な配列」または「相同性」を見せる配列は、少なくとも約65％、70％、75％、80％、85％、または90％の配列同一性を別の核酸分子に対して見せる核酸分子の配列を意味する。他の態様において、核酸の「相同的な配列」は93％、95％、または98％の配列同一性を参照核酸に対して見せ得る。

【０３２０】

配列相同性または同一性のパーセンテージが規定されるときには、2つの核酸配列または2つのポリペプチド配列の文脈において、相同性または同一性のパーセンテージは、一般的には、最大の一致のために比較およびアラインメントされたときのそれらの長さのある部分に渡っての2以上の配列のアラインメントを言う。別様に申し立てられない限り、配列相同性または同一性は、核酸、ポリペプチド、またはその部分の規定された長さに渡

って評価される。いくつかの態様において、相同性または同一性は、長さの機能的な部分または規定された部分に渡って評価される。

【０３２１】

配列相同性の評価のための配列のアラインメントは、当分野において公知のアルゴリズム、例えばAltschul et al, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990に記載されているBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)アルゴリズムによって実施され得る。BLAST分析を行うための公に利用可能なインターネットインターフェースは国立生物工学情報センターから利用可能である。追加の公知のアルゴリズムは:Smith & Waterman, "Comparison of Biosequences", Adv. Appl. Math. 2:482, 1981;Needleman & Wunsch, "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins" J. Mol. Biol. 48:443, 1970;Pearson & Lipman "Improved tools for biological sequence comparison", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988に;またはこれらのもしくは類似のアルゴリズムの自動化された実装によって公開されているものを包含する。グローバルアラインメントプログラムもまた大体等しいサイズの類似の配列をアラインメントするために用いられ得る。グローバルアラインメントプログラムの例は、EMBOSSパッケージ(Rice P et al., Trends Genet., 2000; 16: 276-277)の一部であるNEEDLE(www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/において利用可能)、およびFASTAパッケージ(Pearson W and Lipman D, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448)の一部であるGGSEARCHプログラムfasta.bioch.Virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=compare&pgm=gnw)を包含する。これらのプログラムの両方はNeedleman-Wunschアルゴリズムに基づく。これは、それらの全長に渡っての2つの配列の最適アラインメント(ギャップを包含する)を見出すために用いられる。配列分析の詳細な議論はAusubel et al ("Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15, 1998)のユニット19.3にもまた見出され得る。

【０３２２】

スペーサー配列

本明細書に使用されるとき、ガイドRNAまたはPEgRNAと関係のある用語「スペーサー配列」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物とアニールすることで、標的部位にてssRNA/ssDNAハイブリッド構造が、および内生DNA鎖の対応するRループssDNA構造が形成される。

【０３２３】

対象

用語「対象」は、本明細書に使用されるとき、個々の生物、例えば、個々の哺乳動物を指す。いくつかの態様において、対象は、ヒトである。いくつかの態様において、対象は、非ヒト哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は、霊長目の非ヒト動物である。いくつかの態様において、対象は、齧歯類の動物である。いくつかの態様において、対象は、ヒツジ、ヤギ、畜牛、ネコ、またはイヌである。いくつかの態様において、対象は、脊椎動物、両生類、爬虫類、魚類、昆虫、飛ぶ昆虫(fly)、または線虫である。いくつかの態様において、対象は、研究動物である。いくつかの態様において、対象は、遺伝子学的に改変されており、例として、遺伝子学的に改変された非ヒト対象である。対象は、いずれの性であってもよく、いずれの発生段階にあってもよい。

【０３２４】

分裂インテイン

インテインは最も頻繁には一続きのドメインとして見出されるが、いくつかは天然に分裂された形態で存在する。このケースでは、2つのフラグメントは別個のポリペプチドとして発現され、スプライシングが生起する、いわゆるタンパク質トランススプライシング

前に会合しなければならない。
【０３２５】
例示の分裂インテインはSsp DnaEインテインであり、これは2つのサブユニット、つまりDnaE-NおよびDnaE-Cを含む。2つの異なるサブユニットは別個の遺伝子、つまりdnaE-nおよびdnaE-cによってコードされ、これらは夫々DnaE-NおよびDnaE-Cサブユニットをコードする。DnaEはSynechocytis sp. PCC6803の天然に存在する分裂インテインであり、夫々がDnaE-NまたはDnaE-Cどちらかとの融合体を含む2つの別個のタンパク質のトランススプライシングを導くことができる。
【０３２６】
追加の天然に存在するまたは操作された分裂インテイン配列は公知であるか、または本明細書に記載の丸ごとのインテイン配列もしくは当該技術分野で利用可能なものから作られ得る。分裂インテイン配列の例は、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 Nostc punctiforme,FEBS Lett,580:1853-1858に見出され得る。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。追加の分裂インテイン配列は例えばWO2013/045632、WO2014/055782、WO2016/069774、およびEP2877490に見出され得る。これらの夫々の内容は参照によって本願に組み込まれる。
【０３２７】
加えて、トランス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.,[0076]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.Biolmol.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経過して機能的な産物を形成する2つの不活性なフラグメントとして、あるタンパク質を発現する機会を提供する。例えば、2つの別個に発現された半分からの完全なPE融合タンパク質の形成について、図66および67に示されているとおりである。
【０３２８】
標的部位
用語「標的部位」は、本明細書に開示のプライム編集因子(PE)によって編集される核酸分子上の配列を言う。さらに、標的部位は、プライム編集因子(PE)およびgRNAの複合体が結合する核酸分子上の配列を言う。
【０３２９】
tPERT
「transプライム編集因子「RNA型(tPERT)」に係る定義を参照。
【０３３０】
一時的な第2鎖へのニック入れ
本明細書に使用されるとき、用語「一時的な第2鎖へのニック入れ」は、未編集鎖中の第2ニックの組み入れが、所望の編集が編集済鎖に組み入れられた後でしか生じない、第2鎖へのニック入れのバリアントを指す。これによって、二本鎖DNA切断へ繋がり得る両鎖上の同時ニックが回避される。第2鎖にニックを入れるガイドRNAは、第2鎖ニックが所望の編集の組み入れ後まで導入されないように、一時的制御のためにデザインされている。これは、編集済鎖のみにマッチするが元のアレルにはマッチしないスペーサー配列をもつgRNAをデザインすることによって達成される。このストラテジーを使用すると、プロトスペーサーと未編集アレルとの間のミスマッチによって、PAM鎖上の編集事象が起きた後まで、sgRNAによるニック入れが疎まれるはずである。
【０３３１】

Transプライム編集

本明細書に使用されるとき、用語「transプライム編集」、または同様に「trans二重プライム編集」は、分裂PEgRNAを利用するプライム編集または二重プライム編集の修飾形態を指すが、すなわち、ここでPEgRNAは、2つ別々の分子:sgRNAおよびtransプライム編集RNA鋳型(tPERT)に分離される。sgRNAが、所望のゲノムの標的部位へ、プライム編集因子を標的化させる(またはより一般に、プライム編集因子のnapDNAbp構成要素を標的化させる)よう働く一方で、一旦tPERTが、プライム編集因子上およびtPERT上に位置付けられた結合ドメインの相互作用によって、プライム編集因子へtransに動員されると、tPERTはポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)によって使用されて新しいDNA配列を標的遺伝子座中へ書き込む。一態様において、結合ドメインは、tPERT上に位置付けられたMS2アプタマーおよびプライム編集因子と融合したMS2cpタンパク質などの、RNA-タンパク質動員部分を包含し得る。transプライム編集の利点は、DNA合成鋳型をガイドRNAから分離させることによって、潜在的により長い長さの鋳型を使用できる点である。

【０３３２】

transプライム編集の態様は図3Gおよび3Hに示される。図3Gは左に、transプライム編集因子複合体の組成物(「RP-PE:gRNA複合体」)を示すが、これは、ポリメラーゼ(例として、逆転写酵素)およびrPERT動員タンパク質(例として、MS2sc)の各々と融合したnapDNAbpを含み、ガイドRNAと複合体化されている。図3Gはさらに、DNA合成鋳型およびプライマー結合配列を包含するPEgRNAの伸長アーム特色を含む、別々のtPERT分子を示す。tPERT分子はまた、RNA-タンパク質動員ドメイン(これは、このケースにおいて、ステムループ構造であり、例えば、MS2アプタマーであり得る)も包含する。図3Hに記載のプロセスに描かれるとおり、RP-PE:gRNA複合体は、標的DNA配列へ結合してニックを入れる。次いで、動員タンパク質(RP)は、tPERTを動員して、DNA標的部位へ結合したプライム編集因子複合体へ共局在化させ、それによってプライマー結合部位が、ニックが入った鎖上のプライマー配列へ結合できるようになり、続いて、ポリメラーゼ(例として、RT)が、DNA合成鋳型に対し、tPERTの5'に至るまでDNAの単鎖を合成できるようになる。

【０３３３】

tPERTは、RNA-タンパク質動員ドメインの5'末上にPBSおよびDNA合成鋳型を含むように、図3Gおよび図3Hに示されているが、他の立体配置のtPERTも、RNA-タンパク質動員ドメインの3'末上に位置付けられるPBSおよびDNA合成鋳型をもつようデザインされてもよい。しかしながら、5'伸長をもつtPERTは、DNAの単鎖の合成がtPERTの5'末にて自然と終始するであろうという利点を有し、よって、プライム編集のDNA合成段階の最中に、RNA-タンパク質動員ドメインのいずれの部分も鋳型として使用するリスクがない。

【０３３４】

Transプライム編集因子RNA鋳型(tPERT)

本明細書に使用されるとき、「transプライム編集因子RNA鋳型(tPERT)」は、transプライム編集またはtrans二重プライム編集に使用される構成要素を指す、プライム編集の修飾バージョンは、PEgRNAを2つの別個の分子:ガイドRNAおよびtPERT分子に分離することによって作動する。tPERT分子は、標的DNA部位にてプライム編集因子複合体と共局在化させて、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型をプライム編集因子へtransで連れていくようプログラムされている。例えば、(1)RP-PE:gRNA複合体および(2)プライマー結合部位とRNA-タンパク質動員ドメインへ結び合わされたDNA合成鋳型とを包含するtPERTを含む2構成要素系を示すtransプライム編集因子(tPE)の態様については、図3Gを参照。ここでRP-PE:gRNA複合体のRP(動員タンパク質)構成要素は、tPERTを、編集されるべき標的部位へ動員させ、それによってPBSおよびDNA合成鋳型がプライム編集因子にtransで結び付けられる。別の言い方をすれば、tPERTは、PEgRNAの伸長アーム(の全部または一部)を含有するよう改変されており、これは、プライマー結合

部位およびDNA合成鋳型を包含する。

【０３３５】

トランジション

本明細書に使用されるとき、「トランジション」は、プリン核酸塩基(A⇔G)の相互変換(interchange)またはピリミジン核酸塩基(C⇔T)の相互変換を指す。このクラスの相互変換は、同様の形状の核酸塩基を伴う。本明細書に開示の組成物および方法は、標的DNA分子において1以上のトランジションを誘導することが可能である。本明細書に開示の組成物および方法はまた、同じ標的DNA分子においてトランジションとトランスバージョンとの両方を誘導することも可能である。これらの変化は、A⇔G、G⇔A、C⇔T、またはT⇔Cを伴う。ワトソン・クリック対の核酸塩基をもつ二本鎖DNAの文脈において、トランスバージョンは、以下の塩基対交換：A:T⇔G:C、G:G⇔A:T、C:G⇔T:A、またはT:A⇔C:Gを指す。本明細書に開示の組成物および方法は、標的DNA分子において1以上のトランジションを誘導することが可能である。本明細書に開示の組成物および方法はまた、同じ標的DNA分子においてトランジションとトランスバージョンとの両方、ならびに欠失および挿入を包含する他のヌクレオチド変化を誘導することも可能である。

【０３３６】

トランスバージョン

本明細書に使用されるとき、「トランスバージョン」は、プリン核酸塩基のピリミジン核酸塩基への相互変換、またはその逆を指し、よって、形状が似ていない核酸塩基の相互変換を伴う。これらの変化は、T⇔A、T⇔G、C⇔G、C⇔A、A⇔T、A⇔C、G⇔C、およびG⇔Tを伴う。Watson-Crick対の核酸塩基をもつ二本鎖DNAの文脈において、トランスバージョンは、以下の塩基対交換：T:A⇔A:T、T:A⇔G:C、C:G⇔G:C、C:G⇔A:T、A:T⇔T:A、A:T⇔C:G、G:C⇔C:G、およびG:C⇔T:Aを指す。本明細書に開示の組成物および方法は、標的DNA分子において1以上のトランスバージョンを誘導することが可能である。本明細書に開示の組成物および方法はまた、同じ標的DNA分子においてトランジションとトランスバージョンとの両方、ならびに欠失および挿入を包含する他のヌクレオチド変化を誘導することも可能である。

【０３３７】

処置

用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」は、本明細書に記載のとおりの疾患もしくは障害、または1以上のその症状の発病を、食い止め、緩和し、遅延させるか、あるいはその進行を阻害することを目的とした臨床的介入を指す。本明細書に使用されるとき、用語「処置」、「処置する」、および「処置すること」は、本明細書に記載のとおりの疾患もしくは障害、または1以上のその症状の発病を、食い止め、緩和し、遅延させるか、あるいはその進行を阻害することを目的とした臨床的介入を指す。いくつかの態様において、処置は、1以上の症状が発症した後、および/または疾患と診断された後、施されてもよい。他の態様において、処置は、症状がない中、例として、症状の発病を予防もしくは遅延させるか、または疾患の発病もしくは進行を阻害するために、施されてもよい。例えば、処置は、症状の発現に先立ち(例として、症状の経歴に照らして、および/または遺伝因子もしくは他の感受性因子に照らして)、感受性のある個体へ施されてもよい。処置はまた、症状が消散した後も、例えば、それらの再発を予防または遅延するため、続けられてもよい。

【０３３８】

トリヌクレオチド反復(repeat)障害

本明細書に使用されるとき、「トリヌクレオチド反復障害」(または代替的に、「拡大反復障害」もしくは「反復拡大障害」)は、ある種の突然変異(あるトリヌクレオチド反復が、ある遺伝子またはイントロンにある)である「トリヌクレオチド反復拡大」によって引き起こされる、一連の遺伝性障害を指す。トリヌクレオチド反復はかつて、ゲノム中のありふれた反復(iterations)であると考えられていたが、1990年代にこれらの障害に分類された。これらDNAの一見した「良性の」伸展(stretches)はときに、拡大して疾

患を引き起こし得る。数種の決定的な特色が、トリヌクレオチド反復拡大によって引き起こされた障害に共通する。第1に、突然変異反復は、体細胞と生殖細胞系列との両方に不安定さを示し、より頻繁にはこれらは代々の遺伝(successive transmissions)で縮小するよりむしろ拡大する。第2に、低年齢の発病およびこれに続く世代における表現型の増大した重症度(予想)は一般に、より大きな反復の長さと相関する。最後に、疾患アレルの親の起源はしばしば、父系の遺伝がこれら障害の多くにとって拡大のより大きなリスクを抱えるという予想に影響を及ぼし得る。

【０３３９】

トリプレット拡大は、DNA複製最中のずれ(slippage)によって引き起こされるものと考えられる。これらの領域におけるDNA配列の反復性に起因して、「ループアウト」構造は、合成されている親鎖と娘鎖との間の相補的な塩基対合を維持しながら、DNA複製最中に形成されることもある。ループアウト構造が娘鎖上の配列から形成された場合、これは反復数の増大をもたらすであろう。しかしながら、ループアウト構造が親鎖上に形成された場合、反復数の減少が生じる。これらの反復の拡大は低減より一般的であるようである。一般に拡大がより大きくなればなるほど、これらは、より疾患を引き起こしやすくなるか、またはより疾患の重症度を増大しやすくなる。この特性は、トリヌクレオチド反復障害に見られる予想の特徴をもたらす。予想は、これら反復の拡大に起因する罹患した家族の代々の世代を通して、発病の年齢が低くなる傾向、および症状の重症度が増す傾向を説明する。

【０３４０】

ヌクレオチド反復障害は、トリプレット反復が非コード領域において生じる障害(すなわち、非コードトリヌクレオチド反復障害)またはコード領域において生じる障害を包含していてもよい。

【０３４１】

本明細書に記載のプライム編集因子(PE)系は、数ある中でも、脆弱X症候群(FRAXA)、脆弱性XE MR(FRAXE)、フリードライヒ運動失調症(FRDA)、筋強直症ジストロフィー(DM)、8型脊髄小脳失調症(SCA8)、および12型脊髄小脳失調症(SCA12)を包含していてもよい、ヌクレオチド反復障害を処置するのに使用されてもよい。

【０３４２】

上流

本明細書に使用されるとき、用語「上流」および「下流」は、5'→3'方向に配向された核酸分子(単鎖または二本鎖であるかに関わらず)中に位置付けられた少なくとも2つの要素の線状の位置を定義する相対的な用語である。とりわけ、第1要素が第2要素に対して5'のどこかに位置付けられている場合、第1要素は、核酸分子中、第2要素の上流にある。例えば、SNPがニック部位の5'側にある場合、SNPは、Cas9に誘導されたニック部位の上流にある。逆に言うと、第1要素が第2要素に対して3'のどこかに位置付けられている場合、第1要素は、核酸分子中、第2要素の下流にある。例えば、SNPがニック部位の3'側にある場合、SNPは、Cas9に誘導されたニック部位の下流にある。核酸分子は、DNA(二本鎖もしくは単鎖)、RNA(二本鎖もしくは単鎖)、またはDNAとRNAとのハイブリッドであり得る。二本鎖分子のどちらの鎖を考慮するのか選択する必要がある場合を除き、上流および下流という用語が核酸分子の単鎖にのみ言及するところ、分析は単鎖核酸分子および二本鎖分子について同じであるしばしば、少なくとも2つの要素の相対的な位置を決定するのに使用され得る二本鎖のDNAの鎖は、「センス」鎖または「コード」鎖である。遺伝学において、「センス」鎖は、5'から3'へ伸びる二本鎖DNA内セグメントであって、3'から5'へ伸びるDNAのアンチセンス鎖または鋳型鎖に相補的である。よって、例として、SNP核酸塩基がセンス鎖またはコード鎖上のプロモーターの3'側にある場合、SNP核酸塩基はゲノムDNA(二本鎖である)中のプロモーター配列の「下流」にある。

【０３４３】

バリアント

本明細書に使用されるとき、用語「バリアント」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はずであり、例として、バリアント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。用語「バリアント」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括する(encompasses)。用語はまた、参照配列の突然変異体、トランケーション体(truncations)、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)を呈示するものも包括する。

【0344】

ベクター

用語「ベクター」は、本明細書に使用されるとき、着目する遺伝子をコードするよう修飾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する(次いでベクターの複製形態を別の宿主細胞中へ移す)ことができる核酸を指す。例示の好適なベクターは、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明らかであろう。

【0345】

野生型

本明細書に使用されるとき、用語「野生型」は、当業者によって理解される専門用語であって、突然変異体もしくはバリアントの形態とは区別されるような、天然に存在するとおりの生物、株、遺伝子、または特徴の典型的な形態を意味する。

【0346】

5'内生DNAフラップ

本願において用いられる用語「内生5'DNAフラップ」は、標的DNA上のPEによって誘導されるニック部位の直ちに下流に所在するDNAの鎖を言う。PEによる標的DNA鎖のニッキングは、ニック部位の上流側の3'ヒドロキシル基およびニック部位の下流側の5'ヒドロキシル基を暴露する。3'ヒドロキシル基で終わる内生鎖は、プライム編集因子のDNAポリメラーゼをプライムするために用いられる(例えば、DNAポリメラーゼは逆転写酵素である)。ニック部位の下流側のかつ暴露された5'ヒドロキシル基で始まる内生鎖は、「5'内生DNAフラップ」と言われ、究極的には除去され、PEgRNAの伸長によってコードされる新たに合成された置き換え鎖(すなわち、「3'置き換えDNAフラップ」)によって置き換えられる。

【0347】

5'内生DNAフラップ除去

本明細書に使用されるとき、用語「5'内生DNAフラップ除去」または「5'フラップ除去」は、RTによって合成された単鎖DNAフラップが競合的に侵入して内生DNAとハイブリダイズしたときに形成される5'内生DNAフラップの除去を指し、そのプロセスにおいて内生鎖に取って代わる。取って代わられたこの内生鎖を除去することは、所望のヌクレオチド変化を含む所望の産物を形成する反応を推進し得る。細胞自身のDNA修復酵素は、5'内生フラップの除去または切除を触媒してもよい(例として、EXO1またはFEN1などの、フラップエンドヌクレアーゼ)。また、宿主細胞も、該5'内生フラップの除去を触媒する1以上の酵素を発現するよう形質転換されていてもよく、これによって産物を形成するプロセスが推進される(例として、フラップエンドヌクレアーゼ)。フラップエンドヌクレアーゼは当該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。

【０３４８】

3'置き換えDNAフラップ

本明細書に使用されるとき、用語「3'置き換えDNAフラップ」、または単に「置き換えDNAフラップ」は、プライム編集因子によって合成され、プライム編集因子PEgRNAの伸長アームによってコードされるDNAの鎖を指す。より具体的には、3'置き換えDNAフラップは、PEgRNAのポリメラーゼ鋳型によってコードされる。3'置き換えDNAフラップは、編集済配列(例として、単一ヌクレオチドの変化)も含有することを除くと、5'内生DNAフラップと同じ配列を含む。3'置き換えDNAフラップは標的DNAとアニールして、5'内生DNAフラップ(これは、例えば、FEN1もしくはEXO1などの5'フラップエンドヌクレアーゼによって、切除され得る)に取って代わるかまたはこれを置き換え、次いで、3'置き換えDNAフラップの3'末を、内生DNAの晒された(5'内生DNAフラップの切除後に晒される)5'ヒドロキシル末と結び合わせるようにライゲートされ、これによってホスホジエステル結合が再形成されて3'置き換えDNAフラップが組み入れられ、1編集済鎖と1未編集鎖とを含有するヘテロ二重鎖DNAが形成される。DNA修復プロセスはヘテロ二重鎖を分解し、編集済鎖の情報を相補鎖へコピーすることによってDNA中へ編集が永続的に組み入れられる。この分解プロセスは、完了まで(to completion)、未編集鎖へニックを入れることによって、すなわち、本明細書に記載のとおりの「第2鎖へのニック入れ」を経由して、さらに推進され得る。

【発明を実施するための形態】

【０３４９】

ある態様の詳細な記載

ゲノム編集のための、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)系の採用は、生命科学に革命をもたらした[1～3]。CRISPRを使用する遺伝子の断絶は今やルーチンとなっているが、単一ヌクレオチドの編集の正確な組み入れは、疾患が原因の多数の突然変異を研究または修正するのに必要であるにも関わらず、大きな課題のままである。相同組み換え修復(HDR)は、かかる編集を達成させることは可能ではあるが、低い効率(しばしば＜5％)、ドナーDNA修復鋳型のための要件、および二本鎖DNA破壊(DSB)形成の有害効果に悩まされている。近年、David Liu教授らの実験室が塩基編集を開発したが、これによってDSBのない効率的な単一ヌクレオチドの編集が達成される。塩基編集因子(BE)は、CRISPR系を塩基修飾デアミナーゼ酵素と組み合わせて、標的C・GまたはA・T塩基対を夫々A・TまたはG・Cへ変換する[4～6]。既に幅広く研究者らによって世界的に使用されているが、現BEは12塩基対の起こり得る変換のうちたった4つしかできず、小さい挿入または欠失を修正することはできない。その上、塩基編集の標的範囲は、標的塩基に隣接する非標的CまたはA塩基の編集(「バイスタンダー(bystander)編集」)によって、およびPAM配列が標的塩基から15±2bpに存在するという要件によって限定されている。したがって、これらの欠点を克服することは、ゲノム編集の基礎研究および治療用途を大幅に広げるであろう。

【０３５０】

塩基編集の利益の多く－つまり、二本鎖破壊の回避およびドナーDNA修復鋳型－を、その大きな欠点を克服しつつ与える、新しい高精度編集アプローチ(例えば古典的プライム編集)が開発されている。本明細書に記載の提案アプローチは、標的にプライムされた逆転写(TPRT)を使用する標的ゲノムの部位での編集済DNA鎖の直接的な組み入れを達成する。本明細書に考察されるデザインにおいて、CRISPRガイドRNA(gRNA)は、所望のヌクレオチド変化を含む単鎖DNAをコードする逆転写酵素(RT)鋳型配列を持つよう改変されるであろう。CRISPRヌクレアーゼ(Cas9)によってニックが入れられた標的部位DNAは、修飾gRNA上の鋳型配列の逆転写のためのプライマーとして働き、いずれの所望のヌクレオチド編集の直接的な組み込みを可能にするであろう。

【０３５１】

標的にプライムされた逆転写(TPRT)または「プライム編集」の機序が、効率および遺伝子の融通性(genetic flexibility)が高い高精度CRISPR/Casベースのゲノム編集を(例として、図1A～1Fの様々な態様において描かれているとおり)行うために活用または採用され得る。Cas9タンパク質-逆転写酵素融合体が使用されて、特定のDNA配列を修飾ガイドRNA(「伸長されたガイドRNA」)で標的にし、標的部位にて単鎖ニックを生成し、および伸長されたgRNA中へ取り入れられた改変逆転写酵素鋳型のためのプライマーとして、ニック入りDNAを使用する。新しく合成された鎖は、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、またはそれらの組み合わせ)を包含することを除けば、ゲノムの標的配列と相同であろう。新しく合成されたDNAの鎖はまた、単鎖DNAフラップと称されることもあるが、これはハイブリダイゼーションを相補的な相同の内生DNA鎖と競合し、これによって対応する内生鎖に取って代わる。ハイブリダイズされたこの中間体の分解は、その結果得られる内生DNAの、取って代わられたフラップの(例として、5'末DNAフラップエンドヌクレアーゼ、FEN1での)除去、合成された単鎖DNAフラップの標的DNAへのライゲーション、ならびに細胞の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。鋳型化(templated)DNA合成が単一ヌクレオチドという高精度を付与することから、このアプローチの幅は極めて広く、基礎科学および治療法における無数の用途に使用され得ることが予見できる。

【０３５２】

本発明は、「多重フラッププライム編集」と呼ばれるゲノム編集のための新たなプラットホームを記載し(例えば、「二重フラッププライム編集」および「四重フラッププライム編集」を包含する)、参照によって本願に組み込まれるAnzalone, A. V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 576, 149-157 (2019)において本発明者らによって記載されている通り、「プライム編集」または「古典的プライム編集」の革新的な進歩を表す。古典的プライム編集は、種々の態様において、ニック部位において単一の3'フラップを重合し、これが同じ鎖上の標的核酸に取り入れられるようになるが、本記載の多重フラッププライム編集システムには別種の構築物、システム、および方法論が関わり、これらは、種々の態様において、異なる鎖上の3'フラップのペアまたは複数ペアを生成し、これらは所望の編集を含む二重鎖を形成し、かつこれらは例えばゲノム上の特異的な遺伝子座または編集部位における標的核酸分子に組み込まれるようになる。種々の側面において、3'フラップのペアまたは複数ペアは二重鎖を形成する。なぜなら、ひとたび本願に記載されるプライム編集因子によって生成されると、それらは互いにアニールする逆相補配列を含むからである。二重鎖は、隣接するニック部位間に位置付けられる内生二重鎖配列を天然に置き換える細胞によって駆動されるメカニズムによって標的部位に組み込まれるようになる。ある態様において、新たな二重鎖配列は、1以上の位置付けに導入され得(例えば、隣接するゲノム遺伝子座にまたは2つの異なる染色体上の位置付けに)、目当ての1以上の配列、例えばタンパク質コード配列、ペプチドコード配列、またはRNAコード配列を含み得る。1つの態様では、多重フラッププライム編集システムによって組み入れられる新たな二重鎖配列は、リコンビナーゼ部位、例えば、BxB1リコンビナーゼattB(38bp)および/もしくはattP(50bp)部位、またはHinリコンビナーゼ、Ginリコンビナーゼ、Tn3リコンビナーゼ、β-sixリコンビナーゼ、CinHリコンビナーゼ、ParAリコンビナーゼ、γδリコンビナーゼ、φC31リコンビナーゼ、TP901リコンビナーゼ、TG1リコンビナーゼ、φBT1リコンビナーゼ、R4リコンビナーゼ、φRV1リコンビナーゼ、φFC1リコンビナーゼ、MR11リコンビナーゼ、A118リコンビナーゼ、U153リコンビナーゼ、およびgp29リコンビナーゼ、Creリコンビナーゼ、FLPリコンビナーゼ、Rリコンビナーゼ、ラムダリコンビナーゼ、HK101リコンビナーゼ、HK022リコンビナーゼ、およびpSAM2リコンビナーゼによって認識されるリコンビナーゼ部位を含み得る。

【０３５３】

種々の側面において、本明細書は多重フラッププライム編集システム(例えば、二重プ

ライム編集システムおよび四重プライム編集システムを包含する)を記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と編集されない相補的なゲノムDNA鎖への編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。二重フラッププライム編集システムにおいては、例えば、2つのpegRNAがゲノム部位の対向する鎖を標的化するために用いられ、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図90)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、二重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットするプライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。4つのPEgRNAを用いる四重フラッププライム編集システムは類似の利点を提供する。

【0354】

[1]napDNAbp

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)を含み得る。

【0355】

一側面において、napDNAbpは少なくとも1つのガイド核酸(例えば、ガイドRNAまたはPEgRNA)と会合または複合体化させられ得る。これが、ガイド核酸またはその部分(例えば、DNA標的のプロトスペーサーにアニールするガイドRNAのスペーサー)に対して相補的であるDNA鎖(すなわち標的鎖)を含むDNA配列に、napDNAbpを局在させる。換言すると、ガイド核酸は、DNA上のプロトスペーサーの相補配列に局在および結合するようにnapDNAbp(例えば、Cas9または等価物)を「プログラム」する。

【0356】

いずれかの好適なnapDNAbpが本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子に用いられ得る。種々の態様において、napDNAbpはいずれかのクラス2 CRISPR-Casシステムであり得、いずれかのII型、V型、またはVI型CRISPR-Cas酵素を包含する。ゲノム編集のためのツールとしてのCRISPR-Casの急速な発達から、Cas9およびCas9オーソログなどのCRISPR-Cas酵素を記載および/または同定するために用いられる命名体系の一定した発達があった。本願は、古いおよび/または新たであり得る命名体系によってCRISPR-Cas酵素を参照する。当業者は、それが古い(すなわち「レガシー」)または新たな命名体系であるかどうかにかかわらず、用いられる命名体系に基づいて、本願において参照されている特定のCRISPR-Cas酵素を同定する能力があるであろう。CRISPR-Cas命名体系はMakarova et al., "Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?," The CRISPR Journal, Vol. 1. No. 5, 2018に鋭意に記載されている。これの内容全体は参照によって本願に組み込まれる。本願のいずれかの所与の場合に用いられる具体的なCRISPR-Cas命名体系は決して限定せず、当業者はどのCRISPR-Cas酵素が参照されているのかを同定する能力があるであろう。

【0357】

例えば、次のII型、V型、およびVI型クラス2 CRISPR-Cas酵素は、次の当該技術分野で認識される古い(すなわちレガシー)および新たな名称を有する。これらの酵素および/またはそれらのバリアントの夫々は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子に用いられ得る:

【表３】

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

*Makarova et al., *CRISPR Journal*, Vol.1, No.5, 2018を参照。

【０３５８】

理論によって拘束されることなしに、本願において企図されるある種のnapDNAbpの作用機序は、Rループを形成するステップを包含する。これによって、napDNAbpは二本鎖DNA標的のほどけを誘導し、それによってnapDNAbpによって結合された領域の鎖を分離する。次いで、ガイドRNAスペーサーがプロトスペーサー配列において「標的鎖」にハイブリダイズする。これは標的鎖に対して相補的である「非標的鎖」を押し除け、これはRループの一本鎖領域を形成する。いくつかの態様では、napDNAbpは1以上のヌクレアーゼ活性を包含し、これは次いでDNAをカットし、種々の型の傷跡を残す。例えば、napDNAbpは、第1の位置付けにおける非標的鎖をカットおよび/または第2の位置付けにおける標的鎖をカットするヌクレアーゼ活性を含み得る。ヌクレアーゼ活性に依存して、標的DNAは「二本鎖切断」を形成するようにカットされ得、これによって両鎖がカットされる。他の態様において、標的DNAは単一の部位でのみカットされ得る。すなわち、DNAは1つの鎖を「ニッキング」される。異なるヌクレアーゼ活性を有する例示の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失活Cas9(「不活性型Cas9」または「dCas9」)を包含する。

【０３５９】

本開示の多重フラッププライム編集因子に関して用いられ得る種々のnapDNAbpの下の記載は、決して限定することを意味されない。多重フラッププライム編集因子は、公知であるかまたは指向性進化もしくは別様の変異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標準的なSpCas9またはいずれかのオーソログCas9タンパク質またはいずれかのバリアントCas9タンパク質を含み得、Cas9のいずれかの天然に存在するバリアント、変異体、または別様に操作されたバージョンを包含する。種々の態様において、Cas9またはCas9バリアント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バリアント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。用いられ得る他のバリアントCas9タンパク質は、(例えば、より容易な送達のために)標準的なSpCas9よりも小

さい分子量を有するかまたは改変もしくは再配置された一次アミノ酸構造(例えば循環置換体フォーマット)を有するものである。

【０３６０】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子はCas9等価物をもまた含み得、収斂進化の結果であるCas12a(Cpf1)およびCas12b1タンパク質を包含する。本願において用いられるnapDNAbp(例えば、SpCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物)は、それらのPAM特異性を変改/増強する種々の改変をもまた含有し得る。最後に、本願は、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%配列同一性を参照Cas9配列、例えば参照SpCas9標準的な配列または参照Cas9等価物(例えばCas12a(Cpf1))に対して有するいずれかのCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物を企図する。

【０３６１】

napDNAbpはCRISPR(クラスター化規則的間隔短回文反復)関連ヌクレアーゼであり得る。上で概説されているとおり、CRISPRは、可動遺伝因子(ウイルス、転移因子、および接合伝達性プラスミド)からの防護を提供する適応免疫系である。CRISPRクラスターは、スペーサー、祖先可動エレメントに対して相補的な配列、および標的侵入核酸を含有する。CRISPRクラスターはCRISPR RNA(crRNA)へと転写およびプロセシングされる。II型CRISPRシステムでは、プレ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)、内生リボヌクレアーゼ3(rnc)、およびCas9タンパク質を要求する。tracrRNAは、プレcrRNAのリボヌクレアーゼ3によって支援されるプロセシングのためのガイドとしての用をなす。続いてCas9/crRNA/tracrRNAは、スペーサーに対して相補的な直線状または環状dsDNA標的をエンド的に切断する。crRNAに対して相補的でない標的鎖は第1にエンド的にカットされ、次いで3'-5'エキソ的にトリミングされる。天然では、DNA結合および切断は典型的にはタンパク質および両方のRNAを要求する。しかしながら、シングルガイドRNA(「sgRNA」または単純に「gRNA」)が、crRNAおよびtracrRNA両方の側面を単一のRNA種上に組み込むようにして操作され得る。例として、Jinek M. et al., Science 337:816-821(2012)を参照(この内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)。

【０３６２】

いくつかの態様では、napDNAbpは、例えば標的配列上においておよび/または標的配列の相補体上において、標的配列の位置付けにおける一方または両方の鎖の切断を導く。いくつかの態様では、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、またはより多くの塩基対以内において、一方または両方の鎖の切断を導く。いくつかの態様では、ベクターは、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して対応する野生型酵素に対して変異している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変異の他の例は、限定なしに、標準的なSpCas9配列をまたは他のCas9バリアントもしくはCas9等価物の同等のアミノ酸位置を参照して、H840A、N854A、およびN863Aを包含する。

【０３６３】

本願において用いられる用語「Casタンパク質」は、天然から得られる全長Casタンパク質、天然に存在するCasタンパク質とは異なる配列を有する組み換えCasタンパク質、または本開示の方法に必要とされる全て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配列へニックを入れる能力をそれでもなお保持するCasタンパク質のいずれ

かのフラグメントを言う。本願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、バリアント(例えば、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、オーソログ、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(例えば、操作されたかまたは組み換えか)にかかわらず包摂し、いずれかのクラス2 CRISPRシステム(例えばII、V、VI型)からのCas9等価物を包含し得、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。これらの内容は参照によって本願に組み込まれる。

【０３６４】

用語「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」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フラグメント、いずれかの生物からのいずれかのCas9ホモログ、オーソログ、またはパラログ、および天然に存在するかまたは操作されたCas9のいずれかの変異体またはバリアントを包摂する。用語Cas9は特に限定することを意味されず、「Cas9または等価物」と言われ得る。例示のCas9タンパク質はさらに本願に記載および/または当該技術分野において記載されており、参照によって本願に組み込まれる。本開示は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子に使用される具体的なCas9について限定されない。

【０３６５】

本願に記されるCas9ヌクレアーゼ配列および構造は当業者には周知である(例として、"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes."Ferretti et al.,J.J.,McShan W.M.,Ajdic D.J.,Savic D.J.,Savic G.,Lyon K.,Primeaux C.,Sezate S.,Suvorov A.N.,Kenton S.,Lai H.S.,Lin S.P.,Qian Y.,Jia H.G.,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)(これら各々の内容全体は参照により本明細書に組み込まれる)を参照)。

【０３６６】

Cas9およびCas9等価物の例が次のとおり提供される;しかしながら、これらの特定の例は限定することを意味されない。本開示の多重フラッププライム編集因子は、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を用い得る。

【０３６７】

<u>A．標準的な野生型SpCas9</u>

1つの態様では、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子構築物は、S.pyogenesからの「標準的なSpCas9」ヌクレアーゼを含み得る。これはゲノム工学のツールとして広く用いられており、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つの別物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変異がCas9上に導入され得、夫々ニッカーゼCas9(nCas9)または不活性型Cas9(dCas9)をもたらす。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ときに、Cas9またはそのバリアント(例えば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。本願において用いられる標準的なSpCas9タンパク質は、次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言う:

【表４－１】

説明	配列	配列番号
SpCas9 *Streptococcus pyogenes* M1 SwissProt 受託番号 Q99ZW2 野生型	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEE LLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKV MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号18
SwissProt 受託番号 Q99ZW2 *Streptococcus pyogenes* の SpCas9 逆翻訳	ATGGATAAAAAATATAGCATTGGCCTGGATATTGGCACCAAC AGCGTGGGCTGGGCGGTGATTACCGATGAATATAAAGTGCCC GAGCAAAAAATTTAAAGTGCTGGGCAACACCGATCGCCATA GCATTAAAAAAAACCTGATTGGCGCGCTGCTGTTTGATAGC GGCGAAACCGCGGAAGCGACCCGCCTGAAACGCACCGCGC GCCGCCGCTATACCCGCCGCAAAAACCGCATTTGCTATCTGC AGGAAATTTTTAGCAACGAAATGGCGAAAGTGGATGATAGC TTTTTTCATCGCCTGGAAGAAAGCTTTCTGGTGGAAGAAGA TAAAAAACATGAACGCCATCCGATTTTTGGCAACATTGTGG ATGAAGTGGCGTATCATGAAAAATATCCGACCATTTATCATC TGCGCAAAAAACTGGTGGATAGCACCGATAAAGCGGATCTG CGCCTGATTTATCTGGCGCTGGCGCATATGATTAAATTTCGC GGCCATTTTCTGATTGAAGGCGATCTGAACCCGGATAACAG CGATGTGGATAAACTGTTTATTCAGCTGGTGCAGACCTATAA CCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATTAACGCGAGCGGCGTG GATGCGAAAGCGATTCTGAGCGCGCGCCTGAGCAAAAGCC	配列番号19

【表４－２】

	GCCGCCTGGAAAACCTGATTGCGCAGCTGCCGGGCGAAAA AAAAAACGGCCTGTTTGGCAACCTGATTGCGCTGAGCCTGG GCCTGACCCCGAACTTTAAAAGCAACTTTGATCTGGCGGAA GATGCGAAACTGCAGCTGAGCAAAGATACCTATGATGATGA TCTGGATAACCTGCTGGCGCAGATTGGCGATCAGTATGCGG ATCTGTTTCTGGCGGCGAAAAACCTGAGCGATGCGATTCTG CTGAGCGATATTCTGCGCGTGAACACCGAAATTACCAAAGC GCCGCTGAGCGCGAGCATGATTAAACGCTATGATGAACATC ATCAGGATCTGACCCTGCTGAAAGCGCTGGTGCGCCAGCAG CTGCCGGAAAAATATAAAGAAATTTTTTTTGATCAGAGCAA AAACGGCTATGCGGGCTATATTGATGGCGGCGCGAGCCAGG AAGAATTTTATAAATTTATTAAACCGATTCTGGAAAAAATGG ATGGCACCGAAGAACTGCTGGTGAAACTGAACCGCGAAGA TCTGCTGCGCAAACAGCGCACCTTTGATAACGGCAGCATTC CGCATCAGATTCATCTGGGCGAACTGCATGCGATTCTGCGCC GCCAGGAAGATTTTTATCCGTTTCTGAAAGATAACCGCGAA AAAATTGAAAAAATTCTGACCTTTCGCATTCCGTATTATGTG GGCCCGCTGGCGCGCGGCAACAGCCGCTTTGCGTGGATGA CCCGCAAAAGCGAAGAAACCATTACCCCGTGGAACTTTGA AGAAGTGGTGGATAAAGGCGCGAGCGCGCAGAGCTTTATTG AACGCATGACCAACTTTGATAAAAACCTGCCGAACGAAAA AGTGCTGCCGAAACATAGCCTGCTGTATGAATATTTTACCGT GTATAACGAACTGACCAAAGTGAAATATGTGACCGAAGGCA TGCGCAAACCGGCGTTTCTGAGCGGCGAACAGAAAAAAGC GATTGTGGATCTGCTGTTTAAAACCAACCGCAAAGTGACCG TGAAACAGCTGAAAGAAGATTATTTTAAAAAAATTGAATGC TTTGATAGCGTGGAAATTAGCGGCGTGGAAGATCGCTTTAA CGCGAGCCTGGGCACCTATCATGATCTGCTGAAAATTATTAA AGATAAAGATTTTCTGGATAACGAAGAAAACGAAGATATTC TGGAAGATATTGTGCTGACCCTGACCCTGTTTGAAGATCGC GAAATGATTGAAGAACGCCTGAAAACCTATGCGCATCTGTT TGATGATAAAGTGATGAAACAGCTGAAACGCCGCCGCTATA CCGGCTGGGGCCGCCTGAGCCGCAAACTGATTAACGGCATT CGCGATAAACAGAGCGGCAAAACCATTCTGGATTTTCTGAA AAGCGATGGCTTTGCGAACCGCAACTTTATGCAGCTGATTC ATGATGATAGCCTGACCTTTAAAGAAGATATTCAGAAAGCG CAGGTGAGCGGCCAGGGCGATAGCCTGCATGAACATATTGC GAACCTGGCGGGCAGCCCGGCGATTAAAAAAGGCATTCTG CAGACCGTGAAAGTGGTGGATGAACTGGTGAAAGTGATGG GCCGCCATAAACCGGAAAACATTGTGATTGAAATGGCGCGC GAAAACCAGACCACCCAGAAAGGCCAGAAAAACAGCCGC GAACGCATGAAACGCATTGAAGAAGGCATTAAAGAACTGG GCAGCCAGATTCTGAAAGAACATCCGGTGGAAAACACCCA GCTGCAGAACGAAAAACTGTATCTGTATTATCTGCAGAACG GCCGCGATATGTATGTGGATCAGGAACTGGATATTAACCGCC TGAGCGATTATGATGTGGATCATATTGTGCCGCAGAGCTTTC TGAAAGATGATAGCATTGATAACAAAGTGCTGACCCGCAGC GATAAAAACCGCGGCAAAAGCGATAACGTGCCGAGCGAAG AAGTGGTGAAAAAAATGAAAAACTATTGGCGCCAGCTGCT GAACGCGAAACTGATTACCCAGCGCAAATTTGATAACCTGA CCAAAGCGGAACGCGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAAGC GGGCTTTATTAAACGCCAGCTGGTGGAAACCCGCCAGATTA CCAAACATGTGGCGCAGATTCTGGATAGCCGCATGAACACC AAATATGATGAAAACGATAAACTGATTCGCGAAGTGAAAGT	

10

20

30

40

50

【表４－３】

	GATTACCCTGAAAAGCAAACTGGTGAGCGATTTTCGCAAAG ATTTTCAGTTTTATAAAGTGCGCGAAATTAACAACTATCATC ATGCGCATGATGCGTATCTGAACGCGGTGGTGGGCACCGCG CTGATTAAAAAATATCCGAAACTGGAAAGCGAATTTGTGTAT GGCGATTATAAAGTGTATGATGTGCGCAAAATGATTGCGAAA AGCGAACAGGAAATTGGCAAAGCGACCGCGAAATATTTTTT TTATAGCAACATTATGAACTTTTTTAAAACCGAAATTACCCT GGCGAACGGCGAAATTCGCAAACGCCCGCTGATTGAAACC AACGGCGAAACCGGCGAAATTGTGTGGGATAAAGGCCGCG ATTTTGCGACCGTGCGCAAAGTGCTGAGCATGCCGCAGGTG AACATTGTGAAAAAAACCGAAGTGCAGACCGGCGGCTTTA GCAAAGAAAGCATTCTGCCGAAACGCAACAGCGATAAACT GATTGCGCGCAAAAAAGATTGGGATCCGAAAAAATATGGCG GCTTTGATAGCCCGACCGTGGCGTATAGCGTGCTGGTGGTG GCGAAAGTGGAAAAAGGCAAAAGCAAAAAACTGAAAAGC GTGAAAGAACTGCTGGGCATTACCATTATGGAACGCAGCAG CTTTGAAAAAAACCCGATTGATTTTCTGGAAGCGAAAGGCT ATAAAGAAGTGAAAAAAGATCTGATTATTAAACTGCCGAAA TATAGCCTGTTTGAACTGGAAAACGGCCGCAAACGCATGCT GGCGAGCGCGGGCGAACTGCAGAAAGGCAACGAACTGGC GCTGCCGAGCAAATATGTGAACTTTCTGTATCTGGCGAGCC ATTATGAAAAACTGAAAGGCAGCCCGGAAGATAACGAACA GAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCATAAACATTATCTGGATG AAATTATTGAACAGATTAGCGAATTTAGCAAACGCGTGATTC TGGCGGATGCGAACCTGGATAAAGTGCTGAGCGCGTATAAC AAACATCGCGATAAACCGATTCGCGAACAGGCGGAAAACAT TATTCATCTGTTTACCCTGACCAACCTGGGCGCGCCGGCGGC GTTTAAATATTTTGATACCACCATTGATCGCAAACGCTATACC AGCACCAAAGAAGTGCTGGATGCGACCCTGATTCATCAGAG CATTACCGGCCTGTATGAAACCCGCATTGATCTGAGCCAGCT GGGCGGCGAT	

【０３６８】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、標準的なSpCas9、または上で提供されている野生型Cas9配列との少なくとも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％配列同一性を有するそのいずれかのバリアントを包含し得る。これらのバリアントは、1以上の変異を含有するSpCas9バリアントを包含し得、SwissProtアクセッションNo.Q99ZW2(配列番号18)エントリーで報告されているいずれかの公知の変異を包含する。これらは:

【表５】

SpCas9変異(標準的なSpCas9配列のアミノ酸配列、配列番号18に対して相対的)	機能/特徴(報告されたとおり)(参照によって本願に組み込まれるUniProtKB - Q99ZW2(CAS9_STRPT1)エントリーを見よ)
D10A	プロトスペーサー鎖を切断するニッカーゼ変異体(非プロトスペーサー鎖の切断はなし)
S15A	減少したDNA切断活性
R66A	減少したDNA切断活性
R70A	DNA切断なし
R74A	減少したDNA切断
R78A	減少したDNA切断
97～150欠失	ヌクレアーゼ活性なし
R165A	減少したDNA切断
175～307欠失	約50%減少したDNA切断
312～409欠失	ヌクレアーゼ活性なし
E762A	ニッカーゼ
H840A	非プロトスペーサー鎖を切断するが、プロトスペーサー鎖は切断しないニッカーゼ変異体
N854A	ニッカーゼ
N863A	ニッカーゼ
H982A	減少したDNA切断
D986A	ニッカーゼ
1099～1368欠失	ヌクレアーゼ活性なし
R1333A	縮減されたDNA結合

を包含する。

【０３６９】

本開示に用いられ得る他の野生型SpCas9配列は:

【表６－１】

説明	配列	配列番号
SpCas9 *Streptococcus pyogenes* MGAS1882 野生型 NC_017053.1	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAA TAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGATTATAAGGTTC CGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCA CAGTATCAAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGGCA GTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAG CTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAGAATCGTATTTGTTAT CTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATG ATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAA GAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTGGAAATAT AGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACTATCT ATCATCTGCGAAAAAAATTGGCAGATTCTACTGATAAAGC GGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAA GTTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTG ATAATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAA ATCTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAG TAGAGTAGATGCTAAAGCGATTCTTTCTGCACGATTGAGTA AATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGT GAGAAGAGAAATGGCTTGTTTGGGAATCTCATTGCTTTGT CATTGGGATTGACCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGG CAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTTACGAT GATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATAT GCTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATT TTACTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATAGTGAAATAACTAA GGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAGCGCTACGATGAAC ATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAA CAACTTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATC AAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGC CAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAAA AATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTG AAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTC TATTCCCCATCAAATTCACTTGGGTGAGCTGCATGCTATTTT GAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAAT CGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTA TTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCAT GGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAA TTTTGAAGAAGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCAT TTATTGAACGCATGACAAACTTTGATAAAAATCTTCCAAAT GAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTT TACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTG AGGGAATGCGAAAACCAGCATTTCTTTCAGGTGAACAGAA GAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAATCGAAAA GTAACCGTTAAGCAATTAAAAGAAGATTATTTCAAAAAAA TAGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTCAGGAGTTGAAGAT AGATTTAATGCTTCATTAGGCGCCTACCATGATTTGCTAAA AATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATG AAGATATCTTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTG AAGATAGGGGGATGATTGAGGAAAGACTTAAAACATATGC TCACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTC GCCGTTATACTGGTTGGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATT AATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATTAGA TTTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCA	配列番号20

10

20

30

40

50

【表６－２】

	GCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGAAGATATTC AAAAAGCACAGGTGTCTGGACAAGGCCATAGTTTACATGA ACAGATTGCTAACTTAGCTGGCAGTCCTGCTATTAAAAAA GGTATTTTACAGACTGTAAAAATTGTTGATGAACTGGTCAA AGTAATGGGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAATGG CACGTGAAAATCAGACAACTCAAAAGGGCCAGAAAAATT CGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAGGTATCAAAG AATTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAAA TACTCAATTGCAAAATGAAAAGCTCTATCTCTATTATCTACA AAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATATTA ATCGTTTAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACAA AGTTTCATTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTACTAAC GCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCAA GTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAAACTATTGGAGAC AACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTGAT AATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACTTG ATAAAGCTGGTTTTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTCGC CAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAGTCGCAT GAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAGAGG TTAAAGTGATTACCTTAAAATCTAAATTAGTTTCTGACTTCC GAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTAACAAT TACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGTTGG AACTGCTTTGATTAAGAAATATCCAAAACTTGAATCGGAGT TTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTCGTAAAATGA TTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGCAA AATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAACAG AAATTACACTTGCAAATGGAGAGATTCGCAAACGCCCTCT AATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGGAT AAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAAGTATTGTCCA TGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAGAC AGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATTTTACCAAAAAGAAAT TCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCCAA AAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATTCA GTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAAGGGAAATCGAAG AAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAATTAT GGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAAATCCGATTGACTTTTTA GAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTAATCA TTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGT CGTAAACGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAG GAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTTA TATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGA AGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCATAAG CATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCT AAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCT TAGTGCATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAA CAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTT GGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGA TCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATGCCA CTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACACGC ATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA	
SpCas9 *Streptococcus pyogenes*	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFGSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLADSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHF	配列番号21

【表６－３】

MGAS1882 野生型 NC_017053.1	LIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQIYNQLFEENPINASRVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKRNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNSEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGAYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDRGM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGHSLHEQIANLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPE NIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEH PVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVD HIVPQSFIKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKN YWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLV ETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLE SEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFF KTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMER SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRM LASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNK HRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTST KEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
SpCas9 *Streptococcus pyogenes* 野生型 SWBC2D7W014	ATGGATAAAAAGTATTCTATTGGTTTAGACATCGGCACTAA TTCCGTTGGATGGGCTGTCATAACCGATGAATACAAAGTAC CTTCAAAGAAATTTAAGGTGTTGGGGAACACAGACCGTCA TTCGATTAAAAAGAATCTTATCGGTGCCCTCCTATTCGATA GTGGCGAAACGGCAGAGGCGACTCGCCTGAAACGAACCG CTCGGAGAAGGTATACACGTCGCAAGAACCGAATATGTTA CTTACAAGAAATTTTTAGCAATGAGATGGCCAAAGTTGAC GATTCTTTCTTTCACCGTTTGGAAGAGTCCTTCCTTGTCGA AGAGGACAAGAAACATGAACGGCACCCCATCTTTGGAAA CATAGTAGATGAGGTGGCATATCATGAAAAGTACCCAACG ATTTATCACCTCAGAAAAAAGCTAGTTGACTCAACTGATAA AGCGGACCTGAGGTTAATCTACTTGGCTCTTGCCCATATGA TAAAGTTCCGTGGGCACTTTCTCATTGAGGGTGATCTAAAT CCGGACAACTCGGATGTCGACAAACTGTTCATCCAGTTAG TACAAACCTATAATCAGTTGTTTGAAGAGAACCCTATAAAT GCAAGTGGCGTGGATGCGAAGGCTATTCTTAGCGCCCGCC TCTCTAAATCCCGACGGCTAGAAAACCTGATCGCACAATTA CCCGGAGAGAAGAAAAATGGGTTGTTCGGTAACCTTATAG CGCTCTCACTAGGCCTGACACCAAATTTTAAGTCGAACTT CGACTTAGCTGAAGATGCCAAATTGCAGCTTAGTAAGGAC ACGTACGATGACGATCTCGACAATCTACTGGCACAAATTG GAGATCAGTATGCGGACTTATTTTTGGCTGCCAAAAACCTT AGCGATGCAATCCTCCTATCTGACATACTGAGAGTTAATAC TGAGATTACCAAGGCGCCGTTATCCGCTTCAATGATCAAAA GGTACGATGAACATCACCAAGACTTGACACTTCTCAAGGC	配列番号22

【表６－４】

	CCTAGTCCGTCAGCAACTGCCTGAGAAATATAAGGAAATAT TCTTTGATCAGTCGAAAAACGGGTACGCAGGTTATATTGAC GGCGGAGCGAGTCAAGAGGAATTCTACAAGTTTATCAAAC CCATATTAGAGAAGATGGATGGGACGGAAGAGTTGCTTGT AAAACTCAATCGCGAAGATCTACTGCGAAAGCAGCGGACT TTCGACAACGGTAGCATTCCACATCAAATCCACTTAGGCG AATTGCATGCTATACTTAGAAGGCAGGAGGATTTTTATCCG TTCCTCAAAGACAATCGTGAAAAGATTGAGAAAATCCTAA CCTTTCGCATACCTTACTATGTGGGACCCCTGGCCCGAGGG AACTCTCGGTTCGCATGGATGACAAGAAAGTCCGAAGAA ACGATTACTCCATGGAATTTTGAGGAAGTTGTCGATAAAG GTGCGTCAGCTCAATCGTTCATCGAGAGGATGACCAACTT TGACAAGAATTTACCGAACGAAAAAGTATTGCCTAAGCAC AGTTTACTTTACGAGTATTTCACAGTGTACAATGAACTCAC GAAAGTTAAGTATGTCACTGAGGGCATGCGTAAACCCGCC TTTCTAAGCGGAGAACAGAAGAAAGCAATAGTAGATCTGT TATTCAAGACCAACCGCAAAGTGACAGTTAAGCAATTGAA AGAGGACTACTTTAAGAAAATTGAATGCTTCGATTCTGTCG AGATCTCCGGGGTAGAAGATCGATTTAATGCGTCACTTGGT ACGTATCATGACCTCCTAAAGATAATTAAAGATAAGGACTT CCTGGATAACGAAGAGAATGAAGATATCTTAGAAGATATAG TGTTGACTCTTACCCTCTTTGAAGATCGGGAAATGATTGAG GAAAGACTAAAAACATACGCTCACCTGTTCGACGATAAGG TTATGAAACAGTTAAAGAGGCGTCGCTATACGGGCTGGGG ACGATTGTCGCGGAAACTTATCAACGGGATAAGAGACAAG CAAAGTGGTAAAACTATTCTCGATTTTCTAAAGAGCGACG GCTTCGCCAATAGGAACTTTATGCAGCTGATCCATGATGAC TCTTTAACCTTCAAAGAGGATATACAAAAGGCACAGGTTT CCGGACAAGGGGACTCATTGCACGAACATATTGCGAATCT TGCTGGTTCGCCAGCCATCAAAAAGGGCATACTCCAGACA GTCAAAGTAGTGGATGAGCTAGTTAAGGTCATGGGACGTC ACAAACCGGAAAACATTGTAATCGAGATGGCACGCGAAA ATCAAACGACTCAGAAGGGGCAAAAAAACAGTCGAGAGC GGATGAAGAGAATAGAAGAGGGTATTAAAGAACTGGGCA GCCAGATCTTAAAGGAGCATCCTGTGGAAAATACCCAATT GCAGAACGAGAAACTTTACCTCTATTACCTACAAAATGGA AGGGACATGTATGTTGATCAGGAACTGGACATAAACCGTT TATCTGATTACGACGTCGATCACATTGTACCCCAATCCTTTT TGAAGGACGATTCAATCGACAATAAAGTGCTTACACGCTC GGATAAGAACCGAGGGAAAAGTGACAATGTTCCAAGCGA GGAAGTCGTAAAGAAAATGAAGAACTATTGGCGGCAGCTC CTAAATGCGAAACTGATAACGCAAAGAAAGTTCGATAACT TAACTAAAGCTGAGAGGGGTGGCTTGTCTGAACTTGACAA GGCCGGATTTATTAAACGTCAGCTCGTGGAAACCCGCCAA ATCACAAAGCATGTTGCACAGATACTAGATTCCCGAATGA ATACGAAATACGACGAGAACGATAAGCTGATTCGGGAAGT CAAAGTAATCACTTTAAAGTCAAAATTGGTGTCGGACTTC AGAAAGGATTTTCAATTCTATAAAGTTAGGGAGATAAATAA CTACCACCATGCGCACGACGCTTATCTTAATGCCGTCGTAG GGACCGCACTCATTAAGAAATACCCGAAGCTAGAAAGTGA GTTTGTGTATGGTGATTACAAAGTTTATGACGTCCGTAAGA TGATCGCGAAAAGCGAACAGGAGATAGGCAAGGCTACAG CCAAATACTTCTTTTATTCTAACATTATGAATTTCTTTAAGA CGGAAATCACTCTGGCAAACGGAGAGATACGCAAACGAC	

【表６－５】

	CTTTAATTGAAACCAATGGGGAGACAGGTGAAATCGTATG GGATAAGGGCCGGGACTTCGCGACGGTGAGAAAAGTTTT GTCCATGCCCCAAGTCAACATAGTAAAGAAAACTGAGGTG CAGACCGGAGGGTTTTCAAAGGAATCGATTCTTCCAAAAA GGAATAGTGATAAGCTCATCGCTCGTAAAAAGGACTGGGA CCCGAAAAAGTACGGTGGCTTCGATAGCCCTACAGTTGCC TATTCTGTCCTAGTAGTGGCAAAAGTTGAGAAGGGAAAAT CCAAGAAACTGAAGTCAGTCAAAGAATTATTGGGGATAAC GATTATGGAGCGCTCGTCTTTTGAAAAGAACCCCATCGAC TTCCTTGAGGCGAAAGGTTACAAGGAAGTAAAAAAGGAT CTCATAATTAAACTACCAAAGTATAGTCTGTTTGAGTTAGA AAATGGCCGAAAACGGATGTTGGCTAGCGCCGGAGAGCTT CAAAAGGGGAACGAACTCGCACTACCGTCTAAATACGTGA ATTTCCTGTATTTAGCGTCCCATTACGAGAAGTTGAAAGGT TCACCTGAAGATAACGAACAGAAGCAACTTTTTGTTGAGC AGCACAAACATTATCTCGACGAAATCATAGAGCAAATTTC GGAATTCAGTAAGAGAGTCATCCTAGCTGATGCCAATCTG GACAAAGTATTAAGCGCATACAACAAGCACAGGGATAAAC CCATACGTGAGCAGGCGGAAAATATTATCCATTTGTTTACT CTTACCAACCTCGGCGCTCCAGCCGCATTCAAGTATTTTGA CACAACGATAGATCGCAAACGATACACTTCTACCAAGGAG GTGCTAGACGCGACACTGATTCACCAATCCATCACGGGAT TATATGAAACTCGGATAGATTTGTCACAGCTTGGGGGTGAC GGATCCCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCGAGCGACTAC AAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTA CAAGGATGACGATGACAAGGCTGCAGGA	
SpCas9 *Streptococcus pyogenes* 野生型 SWBC2D7W014 のコードされた産物	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME	配列番号23

【表６－６】

	RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSPKKKRKVSSDY KDHDGDYKDHDIDYKDDDDKAAG	
SpCas9 *Streptococcus pyogenes* M1GAS 野生型 NC_002737.2	ATGGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGATATCGGCACAAA TAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTC CGTCTAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCA CAGTATCAAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTTGACA GTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAG CTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAGAATCGTATTTGTTAT CTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATG ATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAA GAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCCTATTTTTGGAAATAT AGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACTATCT ATCATCTGCGAAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCG GATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAG TTTCGTGGTCATTTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGAT AATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAAC CTACAATCAATTATTTGAAGAAAACCCTATTAACGCAAGTG GAGTAGATGCTAAAGCGATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAA TCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGTG AGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCA TTGGGTTTGACCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGC AGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTTACGATG ATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGATCAATATG CTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTT TACTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAAG GCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAAACGCTACGATGAACA TCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAAC AACTTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGATCAATCA AAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCC AAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAA ATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGA AGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCT ATTCCCCATCAAATTCACTTGGGTGAGCTGCATGCTATTTT GAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAAT CGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTA TTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCAT GGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAA TTTTGAAGAAGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCAT TTATTGAACGCATGACAAACTTTGATAAAAATCTTCCAAAT GAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTT TACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTG AAGGAATGCGAAAACCAGCATTTCTTTCAGGTGAACAGAA GAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAACAAATCGAAAA GTAACCGTTAAGCAATTAAAAGAAGATTATTTCAAAAAAA TAGAATGTTTTGATAGTGTTGAAATTTCAGGAGTTGAAGAT AGATTTAATGCTTCATTAGGTACCTACCATGATTTGCTAAAA ATTATTAAAGATAAAGATTTTTTGGATAATGAAGAAAATGA AGATATCTTAGAGGATATTGTTTTAACATTGACCTTATTTGA AGATAGGGAGATGATTGAGGAAAGACTTAAAACATATGCT CACCTCTTTGATGATAAGGTGATGAAACAGCTTAAACGTC	配列番号24

【表６－７】

	GCCGTTATACTGGTTGGGGACGTTTGTCTCGAAAATTGATT AATGGTATTAGGGATAAGCAATCTGGCAAAACAATATTAGA TTTTTTGAAATCAGATGGTTTTGCCAATCGCAATTTTATGCA GCTGATCCATGATGATAGTTTGACATTTAAAGAAGACATTC AAAAAGCACAAGTGTCTGGACAAGGCGATAGTTTACATGA ACATATTGCAAATTTAGCTGGTAGCCCTGCTATTAAAAAAG GTATTTTACAGACTGTAAAAGTTGTTGATGAATTGGTCAAA GTAATGGGGCGGCATAAGCCAGAAAATATCGTTATTGAAAT GGCACGTGAAAATCAGACAACTCAAAAGGGCCAGAAAAA TTCGCGAGAGCGTATGAAACGAATCGAAGAAGGTATCAAA GAATTAGGAAGTCAGATTCTTAAAGAGCATCCTGTTGAAA ATACTCAATTGCAAAATGAAAAGCTCTATCTCTATTATCTCC AAAATGGAAGAGACATGTATGTGGACCAAGAATTAGATAT TAATCGTTTAAGTGATTATGATGTCGATCACATTGTTCCACA AAGTTTCCTTAAAGACGATTCAATAGACAATAAGGTCTTAA CGCGTTCTGATAAAAATCGTGGTAAATCGGATAACGTTCCA AGTGAAGAAGTAGTCAAAAAGATGAAAAACTATTGGAGA CAACTTCTAAACGCCAAGTTAATCACTCAACGTAAGTTTG ATAATTTAACGAAAGCTGAACGTGGAGGTTTGAGTGAACT TGATAAAGCTGGTTTTATCAAACGCCAATTGGTTGAAACTC GCCAAATCACTAAGCATGTGGCACAAATTTTGGATAGTCG CATGAATACTAAATACGATGAAAATGATAAACTTATTCGAG AGGTTAAAGTGATTACCTTAAAATCTAAATTAGTTTCTGAC TTCCGAAAAGATTTCCAATTCTATAAAGTACGTGAGATTAA CAATTACCATCATGCCCATGATGCGTATCTAAATGCCGTCGT TGGAACTGCTTTGATTAAGAAATATCCAAAACTTGAATCGG AGTTTGTCTATGGTGATTATAAAGTTTATGATGTTCGTAAAA TGATTGCTAAGTCTGAGCAAGAAATAGGCAAAGCAACCGC AAAATATTTCTTTTACTCTAATATCATGAACTTCTTCAAAAC AGAAATTACACTTGCAAATGGAGAGATTCGCAAACGCCCT CTAATCGAAACTAATGGGGAAACTGGAGAAATTGTCTGGG ATAAAGGGCGAGATTTTGCCACAGTGCGCAAAGTATTGTC CATGCCCCAAGTCAATATTGTCAAGAAAACAGAAGTACAG ACAGGCGGATTCTCCAAGGAGTCAATTTTACCAAAAAGAA ATTCGGACAAGCTTATTGCTCGTAAAAAAGACTGGGATCC AAAAAAATATGGTGGTTTTGATAGTCCAACGGTAGCTTATT CAGTCCTAGTGGTTGCTAAGGTGGAAAAAGGGAAATCGA AGAAGTTAAAATCCGTTAAAGAGTTACTAGGGATCACAAT TATGGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAAATCCGATTGACTTTT TAGAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAAAGACTTAAT CATTAAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACG GTCGTAAACGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAA AGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTT TTATATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCC AGAAGATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCAT AAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATT TTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAG TTCTTAGTGCATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGT GAACAAGCAGAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGACGAA TCTTGGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAAT TGATCGTAAACGATATACGTCTACAAAAGAAGTTTTAGATG CCACTCTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTTATGAAACA CGCATTGATTTGAGTCAGCTAGGAGGTGACTGA	
SpCas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH	配列番号25

【表６－８】

Streptococcus pyogenes M1GAS 野生型 NC_002737.2 のコードされた産物（標準的な Q99ZW2 野生型と100％同一）	SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

を包含する。

【０３７０】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、上のSpCas9配列のいずれか、または少なくとも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％配列同一性をそれに対して有するそのいずれかのバリアントを包含し得る。

【０３７１】

<u>B．野生型Cas9オーソログ</u>

他の態様において、Cas9タンパク質は、S.pyogenesからの標準的なCas9とは異なる別の細菌種からの野生型Cas9オーソログであり得る。例えば、次のCas9オーソログが本明細書に記載される多重フラッププライム編集因子構築物に関して用いられ得る。加えて、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％配列同一性を下のオーソログのいずれかに対して有するいずれかのバリアントCas9オーソログもまた本多重フラッププライム編集因子に用いられ得る。

【表７－１】

説明	配列
LfCas9 *Lactobacillus fermentum* 野生型 *GenBank: SNX31424.1* 1	MKEYHIGLDIGTSSIGWAVTDSQFKLMRIKGKTAIGVRLFEEGKTAAERRTFRTTRR RLKRRKWRLHYLDEIFAPHLQEVDENFLRRLKQSNIHPEDPTKNQAFIGKLLFPDL LKKNERGYPTLIKMRDELPVEQRAHYPVMNIYKLREAMINEDRQFDLREVYLAV HHIVKYRGHFLNNASVDKFKVGRIDFDKSFNVLNEAYEELQNGEGSFTIEPSKVEK IGQLLLDTKMRKLDRQKAVAKLLEVKVADKEETKRNKQIATAMSKLVLGYKADF ATVAMANGNEWKIDLSSETSEDEIEKFREELSDAQNDILTEITSLFSQIMLNEIVPNG MSISESMMDRYWTHERQLAEVKEYLATQPASARKEFDQVYNKYIGQAPKERGFD LEKGLKKILSKKENWKEIDELLKAGDFLPKQRTSANGVIPHQMHQQELDRIIEKQA KYYPWLATENPATGERDRHQAKYELDQLVSFRIPYYVGPLVTPEVQKATSGAKFA WAKRKEDGEITPWNLWDKIDRAESAEAFIKRMTVKDTYLLNEDVLPANSLLYQKY NVLNELNNVRVNGRRLSVGIKQDIYTELFKKKKTVKASDVASLVMAKTRGVNKP SVEGLSDPKKFNSNLATYLDLKSIVGDKVDDNRYQTDLENIIEWRSVFEDGEIFAD KLTEVEWLTDEQRSALVKKRYKGWGRLSKKLLTGIVDENGQRIIDLMWNTDQNF KEIVDQPVFKEQIDQLNQKAITNDGMTLRERVESVLDDAYTSPQNKKAIWQVVRV VEDIVKAVGNAPKSISIEFARNEGNKGEITRSRRTQLQKLFEDQAHELVKDTSLTEE LEKAPDLSDRYYFYFTQGGKDMYTGDPINFDEISTKYDIDHILPQSFVKDNSLDNR VLTSRKENNKKSDQVPAKLYAAKMKPYWNQLLKQGLITQRKFENLTKDVDQNIK YRSLGFVKRQLVETRQVIKLTANILGSMYQEAGTEIIETRAGLTKQLREEFDLPKVR EVNDYHHAVDAYLTTFAGQYLNRRYPKLRSFFVYGEYMKFKHGSDLKLRNFNFF HELMEGDKSQGKVVDQQTGELITTRDEVAKSFDRLLNMKYMLVSKEVHDRSDQL YGATIVTAKESGKLTSPIEIKKNRLVDLYGAYTNGTSAFMTIIKFTGNKPKYKVIGIP TTSAASLKRAGKPGSESYNQELHRIIKSNPKVKKGFEIVVPHVSYGQLIVDGDCKF TLASPTVQHPATQLVLSKKSLETISSGYKILKDKPAIANERLIRVFDEVVGQMNRYF TIFDQRSNRQKVADARDKFLSLPTESKYEGAKKVQVGKTEVITNLLMGLHANATQ GDLKVLGLATFGFFQSTTGLSLSEDTMIVYQSPTGLFERRICLKDI（配列番号26）
SaCas9 *Staphylococcus aureus* 野生型 GenBank: AYD60528.1	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG ETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHF LIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENL IAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLA QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKL NREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYY

【表７－２】

説明	配列
	VGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILED IVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQ SGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGS PAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDH IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQR KFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR EVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESE FVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIE TNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFE KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSK YVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANL DKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD ATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号27）
SaCas9 *Staphylococcus aureus*	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARR LKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLH LAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRG SINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFG WKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE YYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIK DITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTH NLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVV KRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFD NSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTK KEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSING GFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQ MFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTL YSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLI MEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDY PNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAK KLKKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENM NDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK（配列番号28）
StCas9 *Streptococcus thermophilus* UniProtKB/Swiss-Prot: G3ECR1.2 野生型	MLFNKCIIISINLDFSNKEKCMTKPYSIGLDIGTNSVGWAVITDNYKVPSKKMKVLG NTSKKYIKKNLLGVLLFDSGITAEGRRLKRTARRRYTRRRNRILYLQEIFSTEMATL DDAFFQRLDDSFLVPDDKRDSKYPIFGNLVEEKVYHDEFPTIYHLRKYLADSTKKA DLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGEFNSKNNDIQKNFQDFLDTYNAIFESDLSLENS KQLEEIVKDKISKLEKKDRILKLFPGEKNSGIFSEFLKLIVGNQADFRKCFNLDEKA SLHFSKESYDEDLETLLGYIGDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVTDNETEAPLSS AMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNISLKTYNEVFKDDTKNGYAGYIDGKTNQEDFYV YLKNLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAILDKQAKFY PFLAKNKERIEKILTFRIPYYVGPLARGNSDFAWSIRKRNEKITPWNFEDVIDKESSA EAFINRMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQ KKDIVRLYFKDKRKVTDKDIIEYLHAIYGYDGIELKGIEKQFNSSLSTYHDLLNIIN DKEFLDDSSNEAIIEEIIHTLTIFEDREMIKQRLSKFENIFDKSVLKKLSRRHYTGWG KLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIDDGISNRNFMQLIHDDALSFKKKIQKAQIIGDE DKGNIKEVVKSLPGSPAIKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTN QGKSNSQQRLKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNALQNDRLYLYYLQNGKD MYTGDDLDIDRLSNYDIDHIIPQAFLKDNSIDNKVLVSSASNRGKSDDFPSLEVVK

【表７－３】

説明	配列
	KRKTFWYQLLKSKLISQRKFDNLTKAERGGLLPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVAR LLDEKFNNKKDENNRAVRTVKIITLKSTLVSQFRKDFELYKVREINDFHHAHDAYL NAVIASALLKKYPKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNIFKKSISLA DGRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRG KPKGLFNANLSSKPKPNSNENLVGAKEYLDPKKYGGYAGISNSFAVLVKGTIEKGA KKKITNVLEFQGISILDRINYRKDKLNFLLEKGYKDIELIIELPKYSLFELSDGSRRM LASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFVKLLYHAKRISNTINENHRKYVENHKKEFEE LFYYILEFNENYVGAKKNGKLLNSAFQSWQNHSIDELCSSFIGPTGSERKGLFELTS RGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG（配 列 番号29）
LcCas9 *Lactobacillus crispatus* NCBI 参照配列: WP_133478044.1 野生型	MKIKNYNLALTPSTSAVGHVEVDDDLNILEPVHHQKAIGVAKFGEGETAEARRLA RSARRTTKRRANRINHYFNEIMKPEIDKVDPLMFDRIKQAGLSPLDERKEFRTVIFD RPNIASYYHNQFPTIWHLQKYLMITDEKADIRLIYWALHSLLKHRGHFFNTTPMSQ FKPGKLNLKDDMLALDDYNDLEGLSFAVANSPEIEKVIKDRSMHKKEKIAELKKLI VNDVPDKDLAKRNNKIITQIVNAIMGNSFHLNFIFDMDLDKLTSKAWSFKLDDPEL DTKFDAISGSMTDNQIGIFETLQKIYSAISLLDILNGSSNVVDAKNALYDKHKRDLN LYFKFLNTLPDEIAKTLKAGYTLYIGNRKKDLLAARKLLKVNVAKNFSQDDFYKLI NKELKSIDKQGLQTRFSEKVGELVAQNNFLPVQRSSDNVFIPYQLNAITFNKILENQ GKYYDFLVKPNPAKKDRKNAPYELSQLMQFTIPYYVGPLVTPEEQVKSGIPKTSRF AWMVRKDNGAITPWNFYDKVDIEATADKFIKRSIAKDSYLLSELVLPKHSLLYEKY EVFNELSNVSLDGKKLSGGVKQILFNEVFKKTNKVNTSRILKALAKHNIPGSKITG LSNPEEFTSSLQTYNAWKKYFPNQIDNFAYQQDLEKMIEWSTVFEDHKILAKKLDE IEWLDDDQKKFVANTRLRGWGRLSKRLLTGLKDNYGKSIMQRLETTKANFQQIV YKPEFREQIDKISQAAAKNQSLEDILANSYTSPSNRKAIRKTMSVVDEYIKLNHGK EPDKIFLMFQRSEQEKGKQTEARSKQLNRILSQLKADKSANKLFSKQLADEFSNAI KKSKYKLNDKQYFYFQQLGRDALTGEVIDYDELYKYTVLHIIPRSKLTDDSQNNK VLTKYKIVDGSVALKFGNSYSDALGMPIKAFWTELNRLKLIPKGKLLNLTTDFSTL NKYQRDGYIARQLVETQQIVKLLATIMQSRFKHTKIIEVRNSQVANIRYQFDYFRIK NLNEYYRGFDAYLAAVVGTYLYKVYPKARRLFVYGQYLKPKKTNQENQDMHLD SEKKSQGFNFLWNLLYGKQDQIFVNGTDVIAFNRKDLITKMNTVYNYKSQKISLAI DYHNGAMFKATLFPRNDRDTAKTRKLIPKKKDYDTDIYGGYTSNVDGYMLLAEII KRDGNKQYGFYGVPSRLVSELDTLKKTRYTEYEEKLKEIIKPELGVDLKKIKKIKIL KNKVPFNQVIIDKGSKFFITSTSYRWNYRQLILSAESQQTLMDLVVDPDFSNHKAR KDARKNADERLIKVYEEILYQVKNYMPMFVELHRCYEKLVDAQKTFKSLKISDKA MVLNQILILLHSNATSPVLEKLGYHTRFTLGKKHNLISENAVLVTQSITGLKENHVS IKQML（配列番号30）
PdCas9 *Pedicoccus damnosus* NCBI 参照配列: WP_062913273.1 野生型	MTNEKYSIGLDIGTSSIGFAVVNDNNRVIRVKGKNAIGVRLFDEGKAAADRRSFRT TRRSFRTTRRRLSRRRWRLKLLREIFDAYITPVDEAFFIRLKESNLSPKDSKKQYSG DILFNDRSDKDFYEKYPTIYHLRNALMTEHRKFDVREIYLAIHHIMKFRGHFLNAT PANNFKVGRLNLEEKFEELNDIYQRVFPDESIEFRTDNLEQIKEVLLDNKRSRADRQ RTLVSDIYQSSEDKDIEKRNKAVATEILKASLGNKAKLNVITNVEVDKEAAKEWSIT FDSESIDDDLAKIEGQMTDDGHEIIEVLRSLYSGITLSAIVPENHTLSQSMVAKYDL HKDHLKLFKKLINGMTDTKKAKNLRAAYDGYIDGVKGKVLPQEDFYKQVQVNL DDSAEANEIQTYIDQDIFMPKQRTKANGSIPHQLQQQELDQIIENQKAYYPWLAEL NPNPDKKRQQLAKYKLDELVTFRVPYYVGPMITAKDQKNQSGAEFAWMIRKEPG NITPWNFDQKVDRMATANQFIKRMTTTDTYLLGEDVLPAQSLLYQKFEVLNELNK IRIDHKPISIEQKQQIFNDLFKQFKNVTIKHLQDYLVSQGQYSKRPLIEGLADEKRFN SSLSTYSDLCGIFGAKLVEENDRQEDLEKIIEWSTIFEDKKIYRAKLNDLTWLTDDQ KEKLATKRYQGWGRLSRKLLVGLKNSEHRNIMDILWITNENFMQIQAEPDFAKLV TDANKGMLEKTDSQDVINDLYTSPQNKKAIRQILLVVHDIQNAMHGQAPAKIHVE FARGEERNPRRSVQRQRQVEAAYEKVSNELVSAKVRQEFKEAINNKRDFKDRLFL YFMQGGIDIYTGKQLNIDQLSSYQIDHILPQAFVKDDSLTNRVLTNENQVKADSVPI

10 20 30 40 50

【表７－４】

説明	配列
	DIFGKKMLSVWGRMKDQGLISKGKYRNLTMNPENISAHTENGFINRQLVETRQVI KLAVNILADEYGDSTQIISVKADLSHQMREDFELLKNRDVNDYHHAFDAYLAAFI GNYLLKRYPKLESYFVYGDFKKFTQKETKMRRFNFIYDLKHCDQVVNKETGEIL WTKDEDIKYIRHLFAYKKILVSHEVREKRGALYNQTIYKAKDDKGSGQESKKLIRI KDDKETKIYGGYSGKSLAYMTIVQITKKNKVSYRVIGIPTLALARLNKLENDSTEN NGELYKIIKPQFTHYKVDKKNGEIIETTDDFKIVVSKVRFQQLIDDAGQFFMLASDT YKNNAQQLVISNNALKAINNTNITDCPRDDLERLDNLRLDSAFDEIVKKMDKYFS AYDANNFREKIRNSNLIFYQLPVEDQWENNKITELGKRTVLTRILQGLHANATTTD MSIFKIKTPFGQLRQRSGISLSENAQLIYQSPTGLFERRVQLNKIK（配列番号31）
FnCas9 *Fusobaterium nucleatum* NCBI 参照配列: WP_060798984.1	MKKQKFSDYYLGFDIGTNSVGWCVTDLDYNVLRFNKKDMWGSRLFEEAKTAAE RRVQRNSRRRLKRRKWRLNLLEEIFSNEILKIDSNFFRRLKESSLWLEDKSSKEKFT LFNDDNYKDYDFYKQYPTIFHLRNELIKNPEKKDIRLVYLAIHSIFKSRGHFLFEGQ NLKEIKNFETLYNNLIAFLEDNGINKIIDKNNIEKLEKIVCDSKKGLKDKEKEFKEIF NSDKQLVAIFKLSVGSSVSLNDLFDTDEYKKGEVEKEKISFREQIYEDDKPIYYSIL GEKIELLDIAKTFYDFMVLNNILADSQYISEAKVKLYEEHKKDLKNLKYIIRKYNK GNYDKLFKDKNENNYSAYIGLNKEKSKKEVIEKSRLKIDDLIKNIKGYLPKVEEIEE KDKAIFNKILNKIELKTILPKQRISDNGTLPYQIHEAELEKILENQSKYYDFLNYEEN GIITKDKLLMTFKFRIPYYVGPLNSYHKDKGGNSWIVRKEEGKILPWNFEQKVDIE KSAEEFIKRMTNKCTYLNGEDVIPKDTFLYSEYVILNELNKVQVNDEFLNEENKRK IIDELFKENKKVSEKKFKEYLLVKQIVDGTIELKGVKDSFNSNYISYIRFKDIFGEKL NLDIYKEISEKSILWKCLYGDDKKIFEKKIKNEYGDILTKDEIKKINTFKFNNWGRL SEKLLTGIEFINLETGECYSSVMDALRRTNYNLMELLSSKFTLQESINNENKEMNE ASYRDLIEESYVSPSLKRAIFQTLKIYEEIRKITGRVPKKVFIEMARGGDESMKNKKI PARQEQLKKLYDSCGNDIANFSIDIKEMKNSLISYDNNSLRQKKLYLYYLQFGKCM YTGREIDLDRLLQNNDTYDIDHIYPRSKVIKDDSFDNLVLVLKNENAEKSNEYPVK KEIQEKMKSFWRFLKEKNFISDEKYKRLTGKDDFELRGFMARQLVNVRQTTKEVG KILQQIEPEIKIVYSKAEIASSFREMFDFIKVRELNDTHHAKDAYLNIVAGNVYNTK FTEKPYRYLQEIKENYDVKKIYNYDIKNAWDKENSLEIVKKNMEKNTVNITRFIKE KKGQLFDLNPIKKGETSNEIISIKPKVYNGKDDKLNEKYGYYKSLNPAYFLYVEHK EKNKRIKSFERVNLVDVNNIKDEKSLVKYLIENKKLVEPRVIKKVYKRQVILINDYP YSIVTLDSNKLMDFENLKPLFLENKYEKILKNVIKFLEDNQGKSEENYKFIYLKKK DRYEKNETLESVKDRYNLEFNEMYDKFLEKLDSKDYKNYMNNKKYQELLDVKE KFIKLNLFDKAFTLKSFLDLFNRKTMADFSKVGLTKYLGKIQKISSNVLSKNELYLL EESVTGLFVKKIKL（配列番号32）
EcCas9 *Enterococcus cecorum* NCBI 参照配列: WP_047338501.1 野生型	RRKQRIQILQELLGEEVLKTDPGFFHRMKESRYVVEDKRTLDGKQVELPYALFVD KDYTDKEYYKQFPTINHLIVYLMTTSDTPDIRLVYLALHYYMKNRGNFLHSGDIN NVKDINDILEQLDNVLETFLDGWNLKLKSYVEDIKNIYNRDLGRGERKKAFVNTL GAKTKAEKAFCSLISGGSTNLAELFDDSSLKEIETPKIEFASSSLEDKIDGIQEALED RFAVIEAAKRLYDWKTLTDILGDSSSLAEARVNSYQMHHEQLLELKSLVKEYLDR KVFQEVFVSLNVANNYPAYIGHTKINGKKKELEVKRTKRNDFYSYVKKQVIEPIKK KVSDEAVLTKLSEIESLIEVDKYLPLQVNSDNGVIPYQVKLNELTRIFDNLENRIPVL RENRDKIIKTFKFRIPYYVGSLNGVVKNGKCTNWMVRKEEGKIYPWNFEDKVDL EASAEQFIRRMTNKCTYLVNEDVLPKYSLLYSKYLVLSELNNLRIDGRPLDVKIKQ DIYENVFKKNRKVTLKKIKKYLLKEGIITDDDELSGLADDVKSSLTAYRDFKEKLG HLDLSEAQMENIILNITLFGDDKKLLKKRLAALYPFIDDKSLNRIATLNYRDWGRL SERFLSGITSVDQETGELRTIIQCMYETQANLMQLLAEPYHFVEAIEKENPKVDLES ISYRIVNDLYVSPAVKRQIWQTLLVIKDIKQVMKHDPERIFIEMAREKQESKKTKSR KQVLSEVYKKAKEYEHLFEKLNSLTEEQLRSKKIYLYFTQLGKCMYSGEPIDFENL VSANSNYDIDHIYPQSKTIDDSFNNIVLVKKSLNAYKSNHYPIDKNIRDNEKVKTL WNTLVSKGLITKEKYERLIRSTPFSDEELAGFIARQLVETRQSTKAVAEILSNWFPES EIVYSKAKNVSNFRQDFEILKVRELNDCHHAHDAYLNIVVGNAYHTKFTNSPYRFI KNKANQEYNLRKLLQKVNKIESNGVVAWVGQSENNPGTIATVKKVIRRNTVLISR

【表７－５】

説明	配列
	MVKEVDGQLFDLTLMKKGKGQVPIKSSDERLTDISKYGGYNKATGAYFTFVKSKK RGKVVRSFEYVPLHLSKQFENNNELLKEYIEKDRGLTDVEILIPKVLINSLFRYNGS LVRITGRGDTRLLLVHEQPLYVSNSFVQQLKSVSSYKLKKSENDNAKLTKTATEKL SNIDELYDGLLRKLDLPIYSYWFSSIKEYLVESRTKYIKLSIEEKALVIFEILHLFQSD AQVPNLKILGLSTKPSRIRIQKNLKDTDKMSIIHQSPSGIFEHEIELTSL（配列番号３３）
AhCas9 *Anaerostipes hadrus* NCBI 参照配列: WP_044924278.1 野生型	MQNGFLGITVSSEQVGWAVTNPKYELERASRKDLWGVRLFDKAETAEDRRMFRT NRRLNQRKKNRIHYLRDIFHEEVNQKDPNFFQQLDESNFCEDDRTVEFNFDTNLY KNQFPTVYHLRKYLMETKDKPDIRLVYLAFSKFMKNRGHFLYKGNLGEVMDFEN SMKGFCESLEKFNIDFPTLSDEQVKEVRDILCDHKIAKTVKKKNIITITKVKSKTAK AWIGLFCGCSVPVKVLFQDIDEEIVTDPEKISFEDASYDDYIANIEKGVGIYYEAIVS AKMLFDWSILNEILGDHQLLSDAMIAEYNKHHDDLKRLQKIIKGTGSRELYQDIFI NDVSGNYVCYVGHAKTMSSADQKQFYTFLKNRLKNVNGISSEDAEWIDTEIKNG TLLPKQTKRDNSVIPHQLQLREFELILDNMQEMYPFLKENREKLLKIFNFVIPYYV GPLKGVVRKGESTNWMVPKKDGVIHPWNFDEMVDKEASAECFISRMTGNCSYLF NEKVLPKNSLLYETFEVLNELNPLKINGEPISVELKQRIYEQLFLTGKKVTKKSLTK YLIKNGYDKDIELSGIDNEFHSNLKSHIDFEDYDNLSDEEVEQIILRITVFEDKQLLK DYLNREFVKLSEDERKQICSLSYKGWGNLSEMLLNGITVTDSNGVEVSVMDMLW NTNLNLMQILSKKYGYKAEIEHYNKEHEKTIYNREDLMDYLNIPPAQRRKVNQLI TIVKSLKKTYGVPNKIFFKISREHQDDPKRTSSRKEQLKYLYKSLKSEDEKHLMKE LDELNDHELSNDKVYLYFLQKGRCIYSGKKLNLSRLRKSNYQNDIDYIYPLSAVND RSMNNKVLTGIQENRADKYTYFPVDSEIQKKMKGFWMELVLQGFMTKEKYFRLS RENDFSKSELVSFIEREISDNQQSGRMIASVLQYYFPESKIVFVKEKLISSFKRDFHLI SSYGHNHLQAAKDAYITIVVGNVYHTKFTMDPAIYFKNHKRKDYDLNRLFLENIS RDGQIAWESGPYGSIQTVRKEYAQNHIAVTKRVVEVKGGLFKQMPLKKGHGEYPL KTNDPRFGNIAQYGGYTNVTGSYFVLVESMEKGKKRISLEYVPVYLHERLEDDPG HKLLKEYLVDHRKLNHPKILLAKVRKNSLLKIDGFYYRLNGRSGNALILTNAVELI MDDWQTKTANKISGYMKRRAIDKKARVYQNEFHIQELEQLYDFYLDKLKNGVYK NRKNNQAELIHNEKEQFMELKTEDQCVLLTEIKKLFVCSPMQADLTLIGGSKHTG MIAMSSNVTKADFAVIAEDPLGLRNKVIYSHKGEK（配列番号34）
KvCas9 *Kandleria vitulina* NCBI 参照配列: WP_031589969.1 野生型	MSQNNNKIYNIGLDIGDASVGWAVVDEHYNLLKRHGKHMWGSRLFTQANTAVER RSSRSTRRRYNKRRERIRLLREIMEDMVLDVDPTFFIRLANVSFLDQEDKKDYLKE NYHSNYNLFIDKDFNDKTYYDKYPTIYHLRKHLCESKEKEDPRLIYLALHHIVKYR GNFLYEGQKFSMDVSNIEDKMIDVLRQFNEINLFEYVEDRKKIDEVLNVLKEPLSK KHKAEKAFALFDTTKDNKAAYKELCAALAGNKFNVTKMLKEAELHDEDEKDISF KFSDATFDDAFVEKQPLLGDCVEFIDLLHDIYSWVELQNILGSAHTSEPSISAAMIQ RYEDHKNDLKLLKDVIRKYLPKKYFEVFRDEKSKKNNYCNYINHPSKTPVDEFYK YIKKLIEKIDDPDVKTILNKIELESFMLKQNSRTNGAVPYQMQLDELNKILENQSVY YSDLKDNEDKIRSILTFRIPYYFGPLNITKDRQFDWIIKKEGKENERILPWNANEIVD VDKTADEFIKRMRNFCTYFPDEPVMAKNSLTVSKYEVLNEINKLRINDHLIKRDM KDKMLHTLFMDHKSISANAMKKWLVKNQYFSNTDDIKIEGFQKENACSTSLTPWI DFTKIFGKINESNYDFIEKIIYDVTVFEDKKILRRRLKKEYDLDEEKIKKILKLKYSG WSRLSKKLLSGIKTKYKDSTRTPETVLEVMERTNMNLMQVINDEKLGFKKTIDDA NSTSVSGKFSYAEVQELAGSPAIKRGIWQALLIVDEIKKIMKHEPAHVYIEFARNED EKERKDSFVNQMLKLYKDYDFEDETEKEANKHLKGEDAKSKIRSERLKLYYTQM GKCMYTGKSLDIDRLDTYQVDHIVPQSLLKDDSIDNKVLVLSSENQRKLDDLVIPS SIRNKMYGFWEKLFNNKIISPKKFYSLIKTEFNEKDQERFINRQIVETRQITKHVAQI IDNHYENTKVVTVRADLSHQFRERYHIYKNRDINDFHHAHDAYIATILGTYIGHRF ESLDAKYIYGEYKRIFRNQKNKGKEMKKNNDGFILNSMRNIYADKDTGEIVWDPN YIDRIKKCFYYKDCFVTKKLEENNGTFFNVTVLPNDTNSDKDNTLATVPVNKYRS NVNKYGGFSGVNSFIVAIKGKKKKGKKVIEVNKLTGIPLMYKNADEEIKINYLKQA EDLEEVQIGKEILKNQLIEKDGGLYYIVAPTEIINAKQLILNESQTKLVCEIYKAMKY

【表７－６】

説明	配列
	KNYDNLDSEKIIDLYRLLINKMELYYPEYRKQLVKKFEDRYEQLKVISIEEKCNIIK QILATLHCNSSIGKIMYSDFKISTTIGRLNGRTISLDDISFIAESPTGMYSKKYKL（配列番号35）
EfCas9 *Enterococcus faecalis* NCBI 参照配列: WP_016631044.1 野生型	MRLFEEGHTAEDRRLKRTARRRISRRRNRLRYLQAFFEEAMTDLDENFFARLQESF LVPEDKKWHRHPIFAKLEDEVAYHETYPTIYHLRKKLADSSEQADLRLIYLALAHI VKYRGHFLIEGKLSTENTSVKDQFQQFMVIYNQTFVNGESRLVSAPLPESVLIEEEL TEKASRTKKSEKVLQQFPQEKANGLFGQFLKLMVGNKADFKKVFGLEEEAKITYA SESYEEDLEGILAKVGDEYSDVFLAAKNVYDAVELSTILADSDKKSHAKLSSSMIV RFTEHQEDLKKFKRFIRENCPDEYDNLFKNEQKDGYAGYIAHAGKVSQLKFYQYV KKIIQDIAGAEYFLEKIAQENFLRKQRTFDNGVIPHQIHLAELQAIIHRQAAYYPFLK ENQEKIEQLVTFRIPYYVGPLSKGDASTFAWLKRQSEEPIRPWNLQETVDLDQSAT AFIERMTNFDTYLPSEKVLPKHSLLYEKFMVFNELTKISYTDDRGIKANFSGKEKE KIFDYLFKTRRKVKKKDIIQFYRNEYNTEIVTLSGLEEDQFNASFSTYQDLLKCGLT RAELDHPDNAEKLEDIIKILTIFEDRQRIRTQLSTFKGQFSAEVLKKLERKHYTGWG RLSKKLINGIYDKESGKTILDYLVKDDGVSKHYNRNFMQLINDSQLSFKNAIQKAQ SSEHEETLSETVNELAGSPAIKKGIYQSLKIVDELVAIMGYAPKRIVVEMARENQTT STGKRRSIQRLKIVEKAMAEIGSNLLKEQPTTNEQLRDTRLFLYYMQNGKDMYTG DELSLHRLSHYDIDHIIPQSFMKDDSLDNLVLVGSTENRGKSDDVPSKEVVKDMK AYWEKLYAAGLISQRKFQRLTKGEQGGLTLEDKAHFIQRQLVETRQITKNVAGILD QRYNAKSKEKKVQIITLKASLTSQFRSIFGLYKVREVNDYHHGQDAYLNCVVATTL LKVYPNLAPEFVYGEYPKFQTFKENKATAKAIIYTNLLRFFTEDEPRFTKDGEILWS NSYLKTIKKELNYHQMNIVKKVEVQKGGFSKESIKPKGPSNKLIPVKNGLDPQKY GGFDSPVVAYTVLFTHEKGKKPLIKQEILGITIMEKTRFEQNPILFLEEKGFLRPRVL MKLPKYTLYEFPEGRRRLLASAKEAQKGNQMVLPEHLLTLLYHAKQCLLPNQSES LAYVEQHQPEFQEILERVVDFAEVHTLAKSKVQQIVKLFEANQTADVKEIAASFIQ LMQFNAMGAPSTFKFFQKDIERARYTSIKEIFDATIIYQSPTGLYETRRKVVD（配列番号36）
Staphylococcus aureus Cas9	KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLK RRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLA KRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSI NRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGW KDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEY YEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKD ITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHN LSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKR SFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRT TGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNS FNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKE YLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGF TSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYST RKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIME QYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNS RNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKL KKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMND KRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG（配列番号37）
Geobacillus thermodenitrificans Cas9	MKYKIGLDIGITSIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRLARSARR RLRRRKHRLERIRRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRVEALDRKLNNDEL ARILLHLAKRRGFRSNRKSERTNKENSTMLKHIEENQSILSSYRTVAEMVVKDPKF SLHKRNKEDNYTNTVARDDLEREIKLIFAKQREYGNIVCTEAFEHEYISIWASQRPF ASKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFTVWEHINKLRLVSPGGIRALTDDE RRLIYKQAFHKNKITFHDVRTLLNLPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAY

【表７－７】

説明	配列
	HKIRKAIDSVYGKGAAKSFRPIDFDTFGYALTMFKDDTDIRSYLRNEYEQNGKRM ENLADKVYDEELIEELLNLSFSKFGHLSLKALRNILPYMEQGEVYSTACERAGYTF TGPKKKQKTVLLPNIPPIANPVVMRALTQARKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARELSQ SFDERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTLNPTGLDIVKFKLWSEQNGKCAY SLQPIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTKENREKGNRTPAEYLGL GSERWQQFETFVLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEENEFKNRNLNDTRYISRFLA NFIREHLKFADSDDKQKVYTVNGRITAHLRSRWNFNKNREESNLHHAVDAAIVAC TTPSDIARVTAFYQRREQNKELSKKTDPQFPQPWPHFADELQARLSKNPKESIKAL NLGNYDNEKLESLQPVFVSRMPKRSITGAAHQETLRRYIGIDERSGKIQTVVKKKL SEIQLDKTGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGELGP IIRTIKIIDTTNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPIYTIDMMKGILPN KAIEPNKPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIEFPREKTIKTAVGEEIKIKDLFAYY QTIDSSNGGLSLVSHDNNFSLRSIGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGVAS SSHSKAGETIRPL（配列番号38）
ScCas9 *S. canis* 1375 AA 159.2 kDa	MEKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDDYKVPSKKFKVLGNTNRKSIKKNLMGALLFDS GETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIRYLQEIFANEMAKLDDSFFQRLEESFLVEEDK KNERHPIFGNLADEVAYHRNYPTIYHLRKKLADSPEKADLRLIYLALAHIIKFRGHF LIEGKLNAENSDVAKLFYQLIQTYNQLFEESPLDEIEVDAKGILSARLSKSKRLEKLI AVFPNEKKNGLFGNIIALALGLTPNFKSNFDLTEDAKLQLSKDTYDDDLDELLGQI GDQYADLFSAAKNLSDAILLSDILRSNSEVTKAPLSASMVKRYDEHHQDLALLKT LVRQQFPEKYAEIFKDDTKNGYAGYVDGIGIKHRKRTTKLATQEEFYKFIKPILEKMD GAEELLAKLNRDDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLKELHAILRRQEEFYPFLKENREKIE KILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWLTRKSEEAITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF DEQLPNKKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTERMRKPEFLSGEQKKAIVDLLF KTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEIIGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRHYTGWGRLSR KMINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFSNRNFMQLIHDDSLTFKEEIEKAQVSGQGDSL HEQIADLAGSPAIKKGILQTVKIVDELVKVMGHKPENIVIEMARENQTTTKGLQQS RERKKRIEEGIKELESQILKENPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDHIVPQSFIKDDSIDNKVLTRSVENRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLN AKLITQRKFDNLTKAERGGLSEADKAGFIKRQLVETRQITKHVARILDSRMNTKRD KNDKPIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQLYKVRDINNYHHAHDAYLNAVVGTALIK KYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKRFFYSNIMNFFKTEVKLAN GEIRKRPLIETNGETGEVVWNKEKDFATVRKVLAMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESI LSKRESAKLIPRKKGWDTRKYGGFGSPTVAYSILVVAKVEKGKAKKLKSVKVLVG ITIMEKGSYEKDPIGFLEAKGYKDIKKELIFKLPKYSLFELENGRRRMLASATELQK ANELVLPQHLVRLLYYTQNISATTGSNNLGYIEQHREEFKEIFEKIIDFSEKYILKNK VNSNLKSSFDEQFAVSDSILLSNSFVSLLKYTSFGASGGFTFLDLDVKQGRLRYQTV TEVLDATLIYQSITGLYETRTDLSQLGGD（配列番号39）

【０３７２】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、上のCas9オーソログ配列のいずれか、または少なくとも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％配列同一性をそれに対して有するそのいずれかのバリアントを包含し得る。

【０３７３】

napDNAbpは、Cas9などの天然に存在する酵素の(or)いずれかの好適なホモログおよび/またはオーソログを包含し得る。Cas9ホモログおよび/またはオーソログはS.pyogenesおよびS.thermophilusを包含するがこれらに限定されない種々の種において記載されている。好ましくは、Cas部分はニッカーゼとして構成される(例えば、変異導入されるか、組み換え操作されるか、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できる。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いて当業者には明らかであろう。かかるCas9ヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski,Rhun,and Charpentier,"The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems"(2013)RNA Biology 10:5,726-737に開示されている生物および遺伝子座からのCas9配列を包含する;これの内容全体は参

照によって本願に組み込まれる。いくつかの態様では、Cas9ヌクレアーゼは不活性な(例えば不活性化された)DNA切断ドメインを有する。つまり、Cas9はニッカーゼである。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、表3のバリアントのいずれか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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、上の表のCas9オーソログのいずれか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。

【0374】

C.不活性型Cas9バリアント

ある態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、不活性型Cas9、例えば不活性型SpCas9を包含し得る。これは、Cas9の両方のヌクレアーゼドメイン、つまり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以上の変異を原因として、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%配列同一性をそれに対して有するそのいずれかのバリアントのアミノ酸配列に1以上の置換および/または欠失をもたらす1以上の変異を原因とし得る。

【0375】

本願において用いられる用語「dCas9」は、ヌクレアーゼ不活性(inactive)Cas9もしくはヌクレアーゼ不活性型(dead)Cas9またはその機能的フラグメントを言い、いずれかの生物から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等価物またはその機能的フラグメント、いずれかの生物からのいずれかのdCas9ホモログ、オーソログ、またはパラログ、および天然に存在するかまたは操作されたdCas9のいずれかの変異体またはバリアントを包摂する。用語dCas9は特に限定することを意味されず、「dCas9または等価物」と言われ得る。例示のdCas9タンパク質とdCas9タンパク質を作るための方法とは、さらに本願に記載および/または当該技術分野において記載されており、参照によって本願に組み込まれる。

【0376】

他の態様において、dCas9は、部分的にまたは丸ごとで、Cas9ヌクレアーゼ活性を不活性化する1以上の変異を有する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以外の変異を有するCas9バリアントが提供され、これらは内生Cas9ヌクレアーゼ活性の完全なまたは部分的な不活性化物をもたらし得る(例えば、夫々nCas9またはdCas9)。かかる変異は、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上の他の置換(例えば、HNHヌクレアーゼサブドメインおよび/またはRuvC1サブドメイン上の置換)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。いくつかの態様では、Cas9のバリアントまたはホモログ(例えば、Streptococcus pyogenesからのCas9(NCBI参照配列:NC_017053.1(配列番号20))のバリアント)が提供され、これらは、NCBI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。いくつかの態様では、dCas9のバリアント(例えば、NCBI参照配列:NC_017053.1(配列番号20)のバリアント)が提供され、NC_017053.1(配列番号20)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、またはより多くだけ短いかまたは長いアミノ酸配列を有する。

【0377】

1つの態様では、不活性型Cas9はQ99ZW2の標準的なSpCas9配列に基づき得、D10XおよびH810X置換(下線付きかつ太字)を含む次の配列を有し得、Xはいずれかのアミ

ノ酸であり得、またはバリアントは少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、もしくは少なくとも99％配列同一性をそれに対して有する配列番号40のバリアントであり得る。

【0378】

1つの態様では、不活性型Cas9はQ99ZW2の標準的なSpCas9配列に基づき得、D10AおよびH810A置換(下線付きかつ太字)を含む次の配列を有し得、または少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、もしくは少なくとも99％配列同一性をそれに対して有する配列番号41のバリアントであり得る。

【表8－1】

説明	配列	配列番号
不活性型Cas9またはdCas9 D10X およびH810X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで「X」は、いずれかのアミノ酸である	MDKKYSIGL**X**IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VD**X**IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号40
不活性型Cas9またはdCas9 D10A およびH810A をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGL**A**IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD	配列番号41

【表８－２】

説明	配列	配列番号
	VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

【０３７９】

D．Cas9ニッカーゼバリアント

１つの態様において、本明細書に記載のプライム編集因子はCas9ニッカーゼを含む。用語「Cas9ニッカーゼ」または「nCas9」は、二本鎖DNA分子標的上に一本鎖切断を導入することができるCas9のバリアントを言う。いくつかの態様では、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(例えば標準的なSp Cas9)は、2つの別個のヌクレアーゼドメイン、つまり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。1つの態様では、Cas9ニッカーゼはRuvCヌクレアーゼ活性を不活性化するRuvCドメインの変異を含む。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の変異は、RuvCヌクレアーゼドメインの機能喪失変異および機能的なCas9ニッカーゼの生出として報告されている(例えば、Nishimasu et al., "Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA,"Cell 156(5),935-949。これは参照によって本願に組み込まれる)。それゆえに、RuvCドメインのニッカーゼ変異は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。ある態様において、ニッカーゼはD10A、もしくは(of)H983A、もしくはD986A、もしくはE762A、またはそれらの組み合わせであり得る。

【０３８０】

種々の態様において、Cas9ニッカーゼはRuvCヌクレアーゼドメインに変異を有し得、次のアミノ酸配列の1つ、または少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、もしくは少なくとも99％配列同一性をそれに対して有するアミノ酸配列を有するそのバリアントを有し得る。

【表９－１】

説明	配列	配列番号
Cas9 ニッカーゼ D10X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれかのアミノ酸である	MDKKYSIGL**X**IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号42
Cas9 ニッカーゼ E762X をもつ、*Streptococcus*	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK	配列番号43

【表９－２】

説明	配列	配列番号
pyogenes Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれかのアミノ酸である	NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVI**X**MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9 ニッカーゼ H983X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれかのアミノ酸である	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYH**X**AHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP	配列番号44

【表９－３】

説明	配列	配列番号
	KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9 ニッカーゼ D986X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれかのアミノ酸である	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH**X**AYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号45
Cas9 ニッカーゼ D10A をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGL**A**IGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN	配列番号46

【表９－４】

説明	配列	配列番号
	ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9 ニッカーゼ E762A をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVI**A**MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号47

【表９－５】

説明	配列	配列番号
Cas9 ニッカーゼ H983A をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYH**A**AHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号48
Cas9 ニッカーゼ D986A をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD	配列番号49

【表９－６】

説明	配列	配列番号
	VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH**A**AYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

【０３８１】

別の態様では、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の変異は、HNHヌクレアーゼドメインの機能喪失変異および機能的なCas9ニッカーゼの生出として報告されている(例えば、Nishimasu et al.,"Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA,"Cell 156(5),935-949。これは参照によって本願に組み込まれる)。それゆえに、HNHドメインのニッカーゼ変異はH840XおよびR863X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。ある態様において、ニッカーゼはH840AもしくはR863Aまたはそれらの組み合わせであり得る。

【０３８２】

種々の態様において、Cas9ニッカーゼはHNHヌクレアーゼドメインの変異を有し得、次のアミノ酸配列の1つ、または少なくとも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％配列同一性をそれに対して有するアミノ酸配列を有するそのバリアントを有し得る。

【表１０－１】

説明	配列	配列番号
Cas9 ニッカーゼ H840X をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれか代わりのアミノ酸である	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VD**X**IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号50
Cas9 ニッカーゼ H840A をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD	配列番号51

10 20 30 40 50

【表１０－２】

説明	配列	配列番号
	VDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	
Cas9 ニッカーゼ R863X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれか代わりのアミノ酸である	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN**X**GKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号52
Cas9 ニッカーゼ R863A をもつ、*Streptococcus*	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE IFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI LSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKS NFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAK	配列番号53

【表１０－３】

説明	配列	配列番号
pyogenes Q99ZW2 Cas9	NLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAI LRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAW MTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNE KVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKK AIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHK PENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILK EHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN**A**GKSDNVPSEEVVKK MKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKR QLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIM NFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV LSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDP KKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIME RSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNE QKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYN KHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTS TKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	

【０３８３】

いくつかの態様では、Ｎ末端メチオニンが、Ｃａｓ９ニッカーゼから、または本願において開示もしくは企図されるいずれかのＣａｓ９バリアント、オーソログ、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、次の配列、または少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％配列同一性をそれらに対して有するアミノ酸配列を有するそれらのバリアントを包含する。

【表１１－１】

説明	配列
Cas9 ニッカーゼ(Met マイナス) H840X をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれか代わりのアミノ酸である	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTE ITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYV DQELDINRLSDYDVD**X**IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY TSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号54）
Cas9 ニッカーゼ(Met マイナス) H840A をもつ、 *Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTE ITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYV DQELDINRLSDYDVD**A**IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY

【表１１－２】

	TSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号55）
Cas9 ニッカーゼ（Met マイナス） R863X をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9 ここで X は、いずれか代わりのアミノ酸である	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTE ITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYV DQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN**X**GKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY TSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号56）
Cas9 ニッカーゼ（Met マイナス） R863A をもつ、*Streptococcus pyogenes* Q99ZW2 Cas9	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESF LVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTE ITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYI DGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIH LGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYF TVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDY FKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRD KQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYV DQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKN**A**GKSDNVPSEEV VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETR QITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVR EINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKY VNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILAD ANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY

【表１１－３】

	TSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD（配列番号57）

【０３８４】

Ｅ．他のＣａｓ９バリアント

不活性型Ｃａｓ９およびＣａｓ９ニッカーゼバリアントの他に、本願において用いられるＣａｓ９タンパク質は、本明細書に開示のかまたは当該技術分野において公知のいずれかの野生型Ｃａｓ９または変異体Ｃａｓ９（例えば、不活性型Ｃａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼ）、またはフ

ラグメントCas9、または循環置換体Cas9、またはCas9の他のバリアント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バリアント」をもまた包含し得る。いくつかの態様では、Cas9バリアントは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、21、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、またはより多くのアミノ酸変化を、参照Cas9と比較して有し得る。いくつかの態様では、Cas9バリアントは参照Cas9のフラグメント(例えば、gRNA結合ドメインまたはDNA切断ドメイン)を含み、その結果、フラグメントは、野生型Cas9の対応するフラグメントと少なくとも約70％同一、少なくとも約80％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、少なくとも約99％同一、少なくとも約99.5％同一、または少なくとも約99.9％同一である。いくつかの態様では、フラグメントは(is is)、対応する野生型Cas9(例えば配列番号18)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。

【０３８５】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に開示のいずれかのCas9タンパク質のフラグメントであるそれらの機能性を保持するCas9フラグメントをもまた利用し得る。いくつかの態様では、Cas9フラグメントは長さが少なくとも100アミノ酸である。いくつかの態様では、フラグメントは長さが少なくとも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アミノ酸である。

【０３８６】

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子は、次のとおり記載されるCas9バリアントの1つ、またはいずれかの参照Cas9バリアントと少なくとも約70％同一、少なくとも約80％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、少なくとも約99％同一、少なくとも約99.5％同一、もしくは少なくとも約99.9％同一であるそのCas9バリアントを含み得る。

【０３８７】

F．小さいサイズのCas9バリアント

いくつかの態様では、本願において企図される多重フラッププライム編集因子は、標準的なSpCas9配列よりも小さい分子量であるCas9タンパク質を包含する。いくつかの態様では、より小さいサイズのCas9バリアントは、例えば発現ベクター、ナノ粒子、または送達の他の手段による細胞への送達を容易化し得る。ある態様において、より小さいサイズのCas9バリアントは、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。いくつかの態様では、より小さいサイズのCas9バリアントは、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バリアントは、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。

【０３８８】

標準的なSpCas9タンパク質は長さが1368アミノ酸であり、158キロダルトンの予測される分子量を有する。本願において用いられる用語「小さいサイズのCas9バリアント」は、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アミノ酸未満だが、少なくとも約400アミノ酸よりも大きく、かつCas9タンパク質の要求される機能を保持している天然に存在する、操作された、または別様のいずれかのCas9バリアントを言う。Cas9バリアントは、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。

【０３８９】

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子は、次のとおり記載される小さいサイズのCas9バリアントの1つ、またはいずれかの参照の小さいサイズのCas9タンパク質と少なくとも約70％同一、少なくとも約80％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、少なくとも約99％同一、少なくとも約99.5％同一、もしくは少なくとも約99.9％同一である(having)そのCas9バリアントを含み得る。

【表１２－１】

説明	配列	配列番号
SaCas9 *Staphylococcus aureus* 1053 AA 123 kDa	MGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANV ENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSE LSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNE VEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVR GSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLET RRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSV KYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFK QKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHD IKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQ EEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNR LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAII KKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEE IIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNP FNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYL SSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRF SVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSI NGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKE WKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPH QIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRKLINDTLYSTRKDDKGNT LIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKL KLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIK YYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNG VYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEF IASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYL ENMNDKRPPHIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQ IIKK	配列番号58
NmeCas9 *N. meningitidis* 1083 AA 124.5 kDa	MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGV RVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRR LLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPL EWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNA HALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFSRKDL QAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDA VQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQ GSERPLTDTERATLMDEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFK GLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLN LSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALLKHISF DKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNT EEKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARI HIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPN FVGEPKSKDILKLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVE IDAALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQNKGNQTPYEYFNGK DNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFKERNL NDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRG FWGLRKVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYK	配列番号59

【表１２－２】

説明	配列	配列番号
	EMNAFDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFG KPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSSRPEAVHEYVTPLFVS RAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLKD LEKMVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYD KAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRV DVFEKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRAVVQGKDEEDWQLI DDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYFASCHRGTGNINIRI HDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIRPCRLKK RPPVR	
CjCas9 *C. jejuni* 984 AA 114.9 kDa	MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRIFTKVENPKTGES LALPRRLARSARKRLARRKARLNHLKHLIANEFKLNYEDYQ SFDESLAKAYKGSLISPYELRFRALNELLSKQDFARVILHIAK RRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYLYK EYFQKFKENSKEFTNVRNKKESYERCIAQSFLKDELKLIFKK QREFGFSFSKKFEEEVLSVAFYKRALKDFSHLVGNCSFFTDE KRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLKNTEGILYTKDDLNALL NEVLKNGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTYFIEFKKYK EFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDITLIKDEIKLKKALAKYDLN QNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPLMLEGKKYDEACNE LNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTNPVVLRAIKEYRK VLNALLKKYGKVHKINIELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENY KAKKDAELECEKLGLKINSKNILKLRLFKEQKEFCAYSGEKI KISDLQDEKMLEIDHIYPYSRSFDDSYMNKVLVFTKQNQEKL NQTPFEAFGNDSAKWQKIEVLAKNLPTKKQKRILDKNYKDK EQKNFKDRNLNDTRYIARLVLNYTKDYLDFLPLSDDENTKL NDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSAKDRNNHLHH AIDAVIIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYK NKRKFFEPFSGFRQKVLDKIDEIFVSKPERKKPSGALHEETFR KEEEFYQSYGGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDMFRV DIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDW ILMDENYEFCFSLYKDSLILIQTKDMQEPEFVYYNAFTSSTVS LIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAKSIGIQNLKVFE KYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK	配列番号60
GeoCas9 *G. stearothermophilus* 1087 AA 127 kDa	MRYKIGLDIGITSVGWAVMNLDIPRIEDLGVRIFDRAENPQTG ESLALPRRLARSARRRLRRRKHRLERIRRLVIREGILTKEELD KLFEEKHEIDVWQLRVEALDRKLNNDELARVLLHLAKRRGF KSNRKSERSNKENSTMLKHIEENRAILSSYRTVGEMIVKDPK FALHKRNKGENYTNTIARDDLEREIRLIFSKQREFGNMSCTE EFENEYITIWASQRPVASKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATY TFQSFIAWEHINKLRLISPSGARGLTDEERRLLYEQAFQKNKI TYHDIRTLLHLPDDTYFKGIVYDRGESRKQNENIRFLELDAY HQIRKAVDKVYGKGKSSSFLPIDFDTFGYALTLFKDDADIHS YLRNEYEQNGKRMPNLANKVYDNELIEELLNLSFTKFGHLS LKALRSILPYMEQGEVYSSACERAGYTFTGPKKKQKTMLLP NIPPIANPVVMRALTQARKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARDLS QTFDERRKTKKEQDENRKKNETAIRQLMEYGLTLNPTGHDI VKFKLWSEQNGRCAYSLQPIEIERLLEPGYVEVDHVIPYSRSL DDSYTNKVLVLTRENREKGNRIPAEYLGVGTERWQQFETFV LTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEETEFKNRNLNDTRYISRFF ANFIREHLKFAESDDKQKVYTVNGRVTAHLRSRWEFNKNRE ESDLHHAVDAVIVACTTPSDIAKVTAFYQRREQNKELAKKTE PHFPQPWPHFADELRARLSKHPKESIKALNLGNYDDQKLESL QPVFVSRMPKRSVTGAAHQETLRRYVGIDERSGKIQTVVKT	配列番号61

【表１２－３】

説明	配列	配列番号
	KLSEIKLDASGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKA FQEPLYKPKKNGEPGPVIRTVKIIDTKNQVIPLNDGKTVAYNS NIVRVDVFEKDGKYYCVPVYTMDIMKGILPNKAIEPNKPYSE WKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIELPREKTVKTAAGEEINVKD VFVYYKTIDSANGGLELISHDHRFSLRGVGSRTLKRFEKYQV DVLGNIYKVRGEKRVGLASSAHSKPGKTIRPLQSTRD	
LbaCas12a *L. bacterium* 1228 AA 143.9 kDa	MSKLEKFTNCYSLSKTLRFKAIPVGKTQENIDNKRLLVEDEK RAEDYKGVKKLLDRYYLSFINDVLHSIKLKNLNNYISLFRKK TRTEKENKELENLEINLRKEIAKAFKGNEGYKSLFKKDIIETI LPEFLDDKDEIALVNSFNGFTTAFTGFFDNRENMFSEEAKSTS IAFRCINENLTRYISNMDIFEKVDAIFDKHEVQEIKEKILNSDY DVEDFFEGEFFNFVLTQEGIDVYNAIIGGFVTESGEKIKGLNE YINLYNQKTKQKLPKFKPLYKQVLSDRESLSFYGEGYTSDEE VLEVFRNTLNKNSEIFSSIKKLEKLFKNFDEYSSAGIFVKNGP AISTISKDIFGEWNVIRDKWNAEYDDIHLKKKAVVTEKYEDD RRKSFKKIGSFSLEQLQEYADADLSVVEKLKEIIIQKVDEIYK VYGSSEKLFDADFVLEKSLKKNDAVVAIMKDLLDSVKSFEN YIKAFFGEGKETNRDESFYGDFVLAYDILLKVDHIYDAIRNY VTQKPYSKDKFKLYFQNPQFMGGWDKDKETDYRATILRYG SKYYLAIMDKKYAKCLQKIDKDDVNGNYEKINYKLLPGPNK MLPKVFFSKKWMAYYNPSEDIQKIYKNGTFKKGDMFNLND CHKLIDFFKDSISRYPKWSNAYDFNFSETEKYKDIAGFYREV EEQGYKVSFESASKKEVDKLVEEGKLYMFQIYNKDFSDKSH GTPNLHTMYFKLLFDENNHGQIRLSGGAELFMRRASLKKEE LVVHPANSPIANKNPDNPKKTTTLSYDVYKDKRFSEDQYEL HIPIAINKCPKNIFKINTEVRVLLKHDDNPYVIGIDRGERNLLY IVVVDGKGNIVEQYSLNEIINNFNGIRIKTDYHSLLDKKEKER FEARQNWTSIENIKELKAGYISQVVHKICELVEKYDAVIALE DLNSGFKNSRVKVEKQVYQKFEKMLIDKLNYMVDKKSNPC ATGGALKGYQITNKFESFKSMSTQNGFIFYIPAWLTSKIDPST GFVNLLKTKYTSIADSKKFISSFDRIMYVPEEDLFEFALDYKN FSRTDADYIKKWKLYSYGNRIRIFRNPKKNNVFDWEEVCLTS AYKELFNKYGINYQQGDIRALLCEQSDKAFYSSFMALMSLM LQMRNSITGRTDVDFLISPVKNSDGIFYDSRNYEAQENAILPK NADANGAYNIARKVLWAIGQFKKAEDEKLDKVKIAISNKEW LEYAQTSVKH	配列番号62
BhCas12b *B. hisashii* 1108 AA 130.4 kDa	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIAYYMNILKLIR QEAIYEHHEQDPKNPKKVSKAEIQAELWDFVLKMQKCNSFT HEVDKDEVFNILRELYEELVPSSVEKKGEANQLSNKFLYPLV DPNSQSGKGTASSGRKPRWYNLKIAGDPSWEEEKKKWEED KKKDPLAKILGKLAEYGLIPLFIPYTDSNEPIVKEIKWMEKSR NQSVRRLDKDMFIQALERFLSWESWNLKVKEEYEKVEKEY KTLEERIKEDIQALKALEQYEKERQEQLLRDTLNTNEYRLSK RGLRGWREIIQKWLKMDENEPSEKYLEVFKDYQRKHPREA GDYSVYEFLSKKENHFIWRNHPEYPYLYATFCEIDKKKKDA KQQATFTLADPINHPLWVRFEERSGSNLNKYRILTEQLHTEK LKKKLTVQLDRLIYPTESGGWEEKGKVDIVLLPSRQFYNQIF LDIEEKGKHAFTYKDESIKFPLKGTLGGARVQFDRDHLRRYP HKVESGNVGRIYFNMTVNIEPTESPVSKSLKIHRDDFPKVVN FKPKELTEWIKDSKGKKLKSGIESLEIGLRVMSIDLGQRQAA AASIFEVVDQKPDIEGKLFFPIKGTELYAVHRASFNIKLPGETL VKSREVLRKAREDNLKLMNQKLNFLRNVLHFQQFEDITERE KRVTKWISRQENSDVPLVYQDELIQIRELMYKPYKDWVAFL	配列番号63

【表１２－４】

説明	配列	配列番号
	KQLHKRLEVEIGKEVKHWRKSLSDGRKGLYGISLKNIDEIDR TRKFLLRWSLRPTEPGEVRRLEPGQRFAIDQLNHLNALKEDR LKKMANTIIMHALGYCYDVRKKKWQAKNPACQIILFEDLSN YNPYEERSRFENSKLMKWSRREIPRQVALQGEIYGLQVGEV GAQFSSRFHAKTGSPGIRCSVVTKEKLQDNRFFKNLQREGRL TLDKIAVLKEGDLYPDKGGEKFISLSKDRKCVTTHADINAAQ NLQKRFWTRTHGFYKVYCKAYQVDGQTVYIPESKDQKQKII EEFGEGYFILKDGVYEWVNAGKLKIKKGSSKQSSSELVDSDI LKDSFDLASELKGEKLMLYRDPSGNVFPSDKWMAAGVFFG KLERILISKLTNQYSISTIEDDSSKQSM	

【０３９０】

G．Cas9等価物

いくつかの態様では、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子はいずれかのCas9等価物を包含し得る。本願において用いられる用語「Cas9等価物」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り得るおよび/または進化的立場からは無関係であり得るにもかかわらず、本多重フラッププライム編集因子において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。それゆえに、Cas9等価物は進化的に関係する本願に記載または包摂されるいずれかのCas9オーソログ、ホモログ、変異体、またはバリアントを包含するが、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あり得るが、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をもまた包摂する。Cas9等価物が収斂進化によって発生したタンパク質に基づき得るにもかかわらず、ここで記載される多重フラッププライム編集因子は、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等価物を包摂する。例えば、Cas9がCRISPR-CasシステムのII型酵素を言う場合には、Cas9等価物はCRISPR-CasシステムのV型またはVI型酵素を言い得る。

【０３９１】

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。それゆえに、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、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子に用いられることを企図される。加えて、Cas12e(CasX)のいずれかのバリアントまたは改変が想像され、本開示の範囲内である。

【０３９２】

Cas9は広い種々の種において進化した細菌酵素である。しかしながら、本願において企図されるCas9等価物は古細菌からもまた得られ得る。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。

【０３９３】

いくつかの態様では、Cas9等価物はCas12e(CasX)またはCas12d(CasY)を言い得る。これらは例えばBurstein et al.,"New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes."Cell Res.2017 Feb 21.doi:10.1038/cr.2017.21に記載されている。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。ゲノム分解能メタゲノミクスを用いて、生命の古細菌ドメインにおける最初に報告されたCas9を包含するいくつものCRISPR-Casシステムが同定された。この分岐した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つの先には未知のシステムCRISPR-Cas12eおよびCRISPR-Cas12dが発見された。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うちである。いく

つかの態様では、Cas9はCas12eまたはCas12eのバリアントを言う。いくつかの態様では、Cas9はCas12dまたはCas12dのバリアントを言う。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)として用いられ得、本開示の範囲内であるということは了解されるはずである。Liu et al.,"CasX enzymes comprises a distinct family of RNA-guided genome editors,"Nature,2019,Vol.566:218-223をもまた見よ。これらのCas9等価物のいずれかが企図される。

【０３９４】

いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、napDNAbpは天然に存在するCas12e(CasX)またはCas12d(CasY)タンパク質である。いくつかの態様では、napDNAbpは、本願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。

【０３９５】

種々の態様において、核酸プログラム型DNA結合タンパク質は、限定なしに、Cas9(例えば、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規則的間隔短回文反復1である(すなわちCas12a(Cpf1))。Cas9と類似に、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とは別物の特色を有するロバストなDNA干渉を媒介するという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、それは、T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タンパク質は当該技術分野で知られており、先に記載されている。例えばYamano et al.,"Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA."Cell(165)2016,p.949-962;これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。

【０３９６】

なお他の態様において、Casタンパク質はいずれかのCRISPR関連タンパク質を包含し得、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変異を含む(例えば、配列番号18の野生型Cas9ポリペプチドのD10A変異に対応する変異)。

【０３９７】

種々の他の態様において、napDNAbpは次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、Cas1

3b、Cas13c、Cas13d、Cas14、Csn2、xCas9、SpCas9-NG、循環置換Cas9、もしくはアルゴノート(Ago)ドメイン、またはそのバリアント。

【０３９８】

例示のCas9等価物タンパク質配列は次を包含し得る:

【表１３－１】

説明	配列
AsCas12a (これまでCpf1 として知られてい	MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPII DRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAI HDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENAL LRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLIT AVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISRE

10

20

30

40

50

【表１３－２】

た) *Acidaminococcus sp.* *(株 BV3L6)* UniProtKB U2UMQ6	AGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEF KSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSAL CDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKEL SEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWF AVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQ MPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTS EGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITK EIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTS IDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIY NKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKR MAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPN VITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPET PIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQA WSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEK AVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSG FLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDF ILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIEN HRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIR SVLQMRNSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIA LKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN（配列番号64）
AsCas12a ニッカーゼ （例として、 R1226A）	MTQFEGFTNLYQVSKTLRFELIPQGKTLKHIQEQGFIEEDKARNDHYKELKPII DRIYKTYADQCLQLVQLDWENLSAAIDSYRKEKTEETRNALIEEQATYRNAI HDYFIGRTDNLTDAINKRHAEIYKGLFKAELFNGKVLKQLGTVTTTEHENAL LRSFDKFTTYFSGFYENRKNVFSAEDISTAIPHRIVQDNFPKFKENCHIFTRLIT AVPSLREHFENVKKAIGIFVSTSIEEVFSFPFYNQLLTQTQIDLYNQLLGGISRE AGTEKIKGLNEVLNLAIQKNDETAHIIASLPHRFIPLFKQILSDRNTLSFILEEF KSDEEVIQSFCKYKTLLRNENVLETAEALFNELNSIDLTHIFISHKKLETISSAL CDHWDTLRNALYERRISELTGKITKSAKEKVQRSLKHEDINLQEIISAAGKEL SEAFKQKTSEILSHAHAALDQPLPTTLKKQEEKEILKSQLDSLLGLYHLLDWF AVDESNEVDPEFSARLTGIKLEMEPSLSFYNKARNYATKKPYSVEKFKLNFQ MPTLASGWDVNKEKNNGAILFVKNGLYYLGIMPKQKGRYKALSFEPTEKTS EGFDKMYYDYFPDAAKMIPKCSTQLKAVTAHFQTHTTPILLSNNFIEPLEITK EIYDLNNPEKEPKKFQTAYAKKTGDQKGYREALCKWIDFTRDFLSKYTKTTS IDLSSLRPSSQYKDLGEYYAELNPLLYHISFQRIAEKEIMDAVETGKLYLFQIY NKDFAKGHHGKPNLHTLYWTGLFSPENLAKTSIKLNGQAELFYRPKSRMKR MAHRLGEKMLNKKLKDQKTPIPDTLYQELYDYVNHRLSHDLSDEARALLPN VITKEVSHEIIKDRRFTSDKFFFHVPITLNYQAANSPSKFNQRVNAYLKEHPET PIIGIDRGERNLIYITVIDSTGKILEQRSLNTIQQFDYQKKLDNREKERVAARQA WSVVGTIKDLKQGYLSQVIHEIVDLMIHYQAVVVLENLNFGFKSKRTGIAEK AVYQQFEKMLIDKLNCLVLKDYPAEKVGGVLNPYQLTDQFTSFAKMGTQSG FLFYVPAPYTSKIDPLTGFVDPFVWKTIKNHESRKHFLEGFDFLHYDVKTGDF ILHFKMNRNLSFQRGLPGFMPAWDIVFEKNETQFDAKGTPFIAGKRIVPVIEN HRFTGRYRDLYPANELIALLEEKGIVFRDGSNILPKLLENDDSHAIDTMVALIR SVLQMANSNAATGEDYINSPVRDLNGVCFDSRFQNPEWPMDADANGAYHIA LKGQLLLNHLKESKDLKLQNGISNQDWLAYIQELRN（配列番号65）
LbCas12a （これまで Cpf1 として 知られていた） *Lachnospiraceae*	MNYKTGLEDFIGKESLSKTLRNALIPTESTKIHMEEMGVIRDDELRAEKQQEL KEIMDDYYRTFIEEKLGQIQGIQWNSLFQKMEETMEDISVRKDLDKIQNEKR KEICCYFTSDKRFKDLFNAKLITDILPNFIKDNKEYTEEEKAEKEQTRVLFQRF ATAFTNYFNQRRNNFSEDNISTAISFRIVNENSEIHLQNMRAFQRIEQQYPEEV CGMEEEYKDMLQEWQMKHIYSVDFYDRELTQPGIEYYNGICGKINEHMNQF CQKNRINKNDFRMKKLHKQILCKKSSYYEIPFRFESDQEVYDALNEFIKTMK KKEIIRRCVHLGQECDDYDLGKIYISSNKYEQISNALYGSWDTIRKCIKEEYM DALPGKGEKKEEKAEAAAKKEEYRSIADIDKIISLYGSEMDRTISAKKCITEIC DMAGQISIDPLVCNSDIKLLQNKEKTTEIKTILDSFLHVYQWGQTFIVSDIIEK

【表１３－３】

bacterium GAM79 参照配列 WP_119623382.1	DSYFYSELEDVLEDFEGITTLYNHVRSYVTQKPYSTVKFKLHFGSPTLANGW SQSKEYDNNAILLMRDQKFYLGIFNVRNKPDKQIIKGHEKEEKGDYKKMIYN LLPGPSKMLPKVFITSRSGQETYKPSKHILDGYNEKRHIKSSPKFDLGYCWDL IDYYKECIHKHPDWKNYDFHFSDTKDYEDISGFYREVEMQGYQIKWTYISA DEIQKLDEKGQIFLFQIYNKDFSVHSTGKDNLHTMYLKNLFSEENLKDIVLKL NGEAELFFRKASIKTPIVHKKGSVLVNRSYTQTVGNKEIRVSIPEEYYTEIYNY LNHIGKGKLSSEAQRYLDEGKIKSFTATKDIVKNYRYCCDHYFLHLPITINFK AKSDVAVNERTLAYIAKKEDIHIIGIDRGERNLLYISVVDVHGNIREQRSFNIV NGYDYQQKLKDREKSRDAARKNWEEIEKIKELKEGYLSMVIHYIAQLVVKY NAVVAMEDLNYGFKTGRFKVERQVYQKFETMLIEKLHYLVFKDREVCEEGG VLRGYQLTYIPESLKKVGKQCGFIFYVPAGYTSKIDPTTGFVNLFSFKNLTNR ESRQDFVGKFDEIRYDRDKKMFEFSFDYNNYIKKGTILASTKWKVYTNGTRL KRIVVNGKYTSQSMEVELTDAMEKMLQRAGIEYHDGKDLKGQIVEKGIEAEI IDIFRLTVQMRNSRSESEDREYDRLISPVLNDKGEFFDTATADKTLPQDADAN GAYCIALKGLYEVKQIKENWKENEQFPRNKLVQDNKTWFDFMQKKRYL（配列番号66）
PcCas12a - これまでCpf1として知られていた *Prevotella copri* 参照配列 WP_119227726.1	MAKNFEDFKRLYSLSKTLRFEAKPIGATLDNIVKSGLLDEDEHRAASYVKVK KLIDEYHKVFIDRVLDDGCLPLENKGNNNSLAEYYESYVSRAQDEDAKKKF KEIQQNLRSVIAKKLTEDKAYANLFGNKLIESYKDKEDKKKIIDSDLIQFINTA ESTQLDSMSQDEAKELVKEFWGFVTYFYGFFDNRKNMYTAEEKSTGIAYRL VNENLPKFIDNIEAFNRAITRPEIQENMGVLYSDFSEYLNVESIQEMFQLDYY NMLLTQKQIDVYNAIIGGKTDDEHDVKIKGINEYINLYNQQHKDDKLPKLKA LFKQILSDRNAISWLPEEFNSDQEVLNAIKDCYERLAENVLGDKVLKSLLGSL ADYSLDGIFIRNDLQLTDISQKMFGNWGVIQNAIMQNIKRVAPARKHKESEED YEKRIAGIFKKADSFSISYINDCLNEADPNNAYFVENYFATFGAVNTPTMQRE NLFALVQNAYTEVAALLHSDYPTVKHLAQDKANVSKIKALLDAIKSLQHFVK PLLGKGDESDKDERFYGELASLWAELDTVTPLYNMIRNYMTRKPYSQKKIKL NFENPQLLGGWDANKEKDYATIILRRNGLYYLAIMDKDSRKLLGKAMPSDG ECYEKMVYKFFKDVTTMIPKCSTQLKDVQAYFKVNTDDYVLNSKAFNKPLT ITKEVFDLNNVLYGKYKKFQKGYLTATGDNVGYTHAVNVWIKFCMDFLNSY DSTCIYDFSSLKPESYLSLDAFYQDANLLLYKLSFARASVSYINQLVEEGKMY LFQIYNKDFSEYSKGTPNMHTLYWKALFDERNLADVVYKLNGQAEMFYRK KSIENTHPTHPANHPILNKNKDNKKKESLFDYDLIKDRRYTVDKFMFHVPIT MNFKSVGSENINQDVKAYLRHADDMHIIGIDRGERHLLYLVVIDLQGNIKEQ YSLNEIVNEYNGNTYHTNYHDLLDVREEERLKARQSWQTIENIKELKEGYLS QVIHKITQLMVRYHAIVVLEDLSKGFMRSRQKVEKQVYQKFEKMLIDKLNY LVDKKTDVSTPGGLLNAYQLTCKSDSSQKLGKQSGFLFYIPAWNTSKIDPVTG FVNLLDTHSLNSKEKIKAFFSKFDAIRYNKDKKWFEFNLDYDKFGKKAEDTR TKWTLCTRGMRIDTFRNKEKNSQWDNQEVDLTTEMKSLLEHYYIDIHGNLK DAISAQTDKAFFTGLLHILKLTLQMRNSITGTETDYLVSPVADENGIFYDSRSC GNQLPENADANGAYNIARKGLMLIEQIKNAEDLNNVKFDISNKAWLNFAQQ KPYKNG（配列番号67）
ErCas12a - これまでCpf1として知られていた *Eubacterium rectale*	MFSAKLISDILPEFVIHNNNYSASEKEEKTQVIKLFSRFATSFKDYFKNRANCF SANDISSSSCHRIVNDNAEIFFSNALVYRRIVKNLSNDDINKISGDMKDSLKE MSLEEIYSYEKYGEFITQEGISFYNDICGKVNLFMNLYCQKNKENKNLYKLR KLHKQILCIADTSYEVPYKFESDEEVYQSVNGFLDNISSKHIVERLRKIGENY NGYNLDKIYIVSKFYESVSQKTYRDWETINTALEIHYNNILPGNGKSKADKV KKAVKNDLQKSITEINELVSNYKLCPDDNIKAETYIHEISHILNNFEAQELKYN PEIHLVESELKASELKNVLDVIMNAFHWCSVFMTEELVDKDNNFYAELEEIY DEIYPVISLYNLVRNYVTQKPYSTKKIKLNFGIPTLADGWSKSKEYSNNAIILM RDNLYYLGIFNAKNKPDKKIIEGNTSENKGDYKKMIYNLLPGPNKMIPKVFL SSKTGVETYKPSAYILEGYKQNKHLKSSKDFDITFCHDLIDYFKNCIAIHPEW KNFGFDFSDTSTYEDISGFYREVELQGYKIDWTYISEKDIDLLQEKGQLYLFQI

【表１３－４】

参照配列 WP_119223642.1	YNKDFSKKSSGNDNLHTMYLKNLFSEENLKDIVLKLNGEAEIFFRKSSIKNPII HKKGSILVNRTYEAEEKDQFGNIQIVRKTIPENIYQELYKYFNDKSDKELSDE AAKLKNVVGHHEAATNIVKDYRYTYDKYFLHMPITINFKANKTSFINDRILQ YIAKEKDLHVIGIDRGERNLIYVSVIDTCGNIVEQKSFNIVNGYDYQIKLKQQ EGARQIARKEWKEIGKIKEIKEGYLSLVIHEISKMVIKYNAIIAMEDLSYGFKK GRFKVERQVYQKFETMLINKLNYLVFKDISITENGGLLKGYQLTYIPDKLKN VGHQCGCIFYVPAAYTSKIDPTTGFVNIFKFKDLTVDAKREFIKKFDSIRYDSD KNLFCFTFDYNNFITQNTVMSKSSWSVYTYGVRIKRRFVNGRFSNESDTIDIT KDMEKTLEMTDINWRDGHDLRQDIIDYEIVQHIFEIFKLTVQMRNSLSELEDR DYDRLISPVLNENNIFYDSAKAGDALPKDADANGAYCIALKGLYEIKQITEN WKEDGKFSRDKLKISNKDWFDFIQNKRYL（配列番号68）
CsCas12a - これまでCpf1として知られていた *Clostridium sp. AF34-10BH* 参照配列 WP_118538418.1	MNYKTGLEDFIGKESLSKTLRNALIPTESTKIHMEEMGVIRDDELRAEKQQEL KEIMDDYYRAFIEEKLGQIQGIQWNSLFQKMEETMEDISVRKDLDKIQNEKR KEICCYFTSDKRFKDLFNAKLITDILPNFIKDNKEYTEEEKAEKEQTRVLFQRF ATAFTNYFNQRRNNFSEDNISTAISFRIVNENSEIHLQNMRAFQRIEQQYPEEV CGMEEEYKDMLQEWQMKHIYLVDFYDRVLTQPGIEYYNGICGKINEHMNQF CQKNRINKNDFRMKKLHKQILCKKSSYYEIPFRFESDQEVYDALNEFIKTMK EKEIICRCVHLGQKCDDYDLGKIYISSNKYEQISNALYGSWDTIRKCIKEEYM DALPGKGEKKEEKAEAAAKKEEYRSIADIDKIISLYGSEMDRTISAKKCITEIC DMAGQISTDPLVCNSDIKLLQNKEKTTEIKTILDSFLHVYQWGQTFIVSDIIEK DSYFYSELEDVLEDFEGITTLYNHVRSYVTQKPYSTVKFKLHFGSPTLANGW SQSKEYDNNAILLMRDQKFYLGIFNVRNKPDKQIIKGHEKEEKGDYKKMIYN LLPGPSKMLPKVFITSRSGQETYKPSKHILDGYNEKRHIKSSPKFDLGYCWDL IDYYKECIHKHPDWKNYDFHFSDTKDYEDISGFYREVEMQGYQIKWTYISA DEIQKLDEKGQIFLFQIYNKDFSVHSTGKDNLHTMYLKNLFSEENLKDIVLKL NGEAELFFRKASIKTPVVHKKGSVLVNRSYTQTVGDKEIRVSIPEEYYTEIYN YLNHIGRGKLSTEAQRYLEERKIKSFTATKDIVKNYRYCCDHYFLHLPITINFK AKSDIAVNERTLAYIAKKEDIHIIGIDRGERNLLYISVVDVHGNIREQRSFNIVN GYDYQQKLKDREKSRDAARKNWEEIEKIKELKEGYLSMVIHYIAQLVVKYN AVVAMEDLNYGFKTGRFKVERQVYQKFETMLIEKLHYLVFKDREVCEEGGV LRGYQLTYIPESLKKVGKQCGFIFYVPAGYTSKIDPTTGFVNLFSFKNLTNRES RQDFVGKFDEIRYDRDKKMFEFSFDYNNYIKKGTMLASTKWKVYTNGTRL KRIVVNGKYTSQSMEVELTDAMEKMLQRAGIEYHDGKDLKGQIVEKGIEAEI IDIFRLTVQMRNSRSESEDREYDRLISPVLNDKGEFFDTATADKTLPQDADAN GAYCIALKGLYEVKQIKENWKENEQFPRNKLVQDNKTWFDFMQKKRYL（配列番号 69）
BhCas12b *Bacillus hisashii* 参照配列 WP_095142515.1	MATRSFILKIEPNEEVKKGLWKTHEVLNHGIAYYMNILKLIRQEAIYEHHEQD PKNPKKVSKAEIQAELWDFVLKMQKCNSFTHEVDKDEVFNILRELYEELVPS SVEKKGEANQLSNKFLYPLVDPNSQSGKGTASSGRKPRWYNLKIAGDPSWEE EKKKWEEDKKKDPLAKILGKLAEYGLIPLFIPYTDSNEPIVKEIKWMEKSRN QSVRRLDKDMFIQALERFLSWESWNLKVKEEYEKVEKEYKTLEERIKEDIQA LKALEQYEKERQEQLLRDTLNTNEYRLSKRGLRGWREIIQKWLKMDENEPS EKYLEVFKDYQRKHPREAGDYSVYEFLSKKENHFIWRNHPEYPYLYATFCEI DKKKKDAKQQATFTLADPINHPLWVRFEERSGSNLNKYRILTEQLHTEKLKK KLTVQLDRLIYPTESGGWEEKGKVDIVLLPSRQFYNQIFLDIEEKGKHAFTYK DESIKFPLKGTLGGARVQFDRDHLRRYPHKVESGNVGRIYFNMTVNIEPTESP VSKSLKIHRDDFPKVVNFKPKELTEWIKDSKGKKLKSGIESLEIGLRVMSIDL GQRQAAAASIFEVVDQKPDIEGKLFFPIKGTELYAVHRASFNIKLPGETLVKSR EVLRKAREDNLKLMNQKLNFLRNVLHFQQFEDITEREKRVTKWISRQENSD VPLVYQDELIQIRELMYKPYKDWVAFLKQLHKRLEVEIGKEVKHWRKSLSD GRKGLYGISLKNIDEIDRTRKFLLRWSLRPTEPGEVRRLEPGQRFAIDQLNHLN ALKEDRLKKMANTIIMHALGYCYDVRKKKWQAKNPACQIILFEDLSNYNPY EERSRFENSKLMKWSRREIPRQVALQGEIYGLQVGEVGAQFSSRFHAKTGSP

【表１３－５】

	GIRCSVVTKEKLQDNRFFKNLQREGRLTLDKIAVLKEGDLYPDKGGEKFISLS KDRKCVTTHADINAAQNLQKRFWTRTHGFYKVYCKAYQVDGQTVYIPESK DQKQKIIEEFGEGYFILKDGVYEWVNAGKLKIKKGSSKQSSSELVDSDILKDS FDLASELKGEKLMLYRDPSGNVFPSDKWMAAGVFFGKLERILISKLTNQYSIS TIEDDSSKQSM（配列番号70）
ThCas12b *Thermomonas hydrothermalis* 参照配列 WP_072754838	MSEKTTQRAYTLRLNRASGECAVCQNNSCDCWHDALWATHKAVNRGAKAF GDWLLTLRGGLCHTLVEMEVPAKGNNPPQRPTDQERRDRRVLLALSWLSVE DEHGAPKEFIVATGRDSADDRAKKVEEKLREILEKRDFQEHEIDAWLQDCGP SLKAHIREDAVWVNRRALFDAAVERIKTLTWEEAWDFLEPFFGTQYFAGIGD GKDKDDAEGPARQGEKAKDLVQKAGQWLSARFGIGTGADFMSMAEAYEKI AKWASQAQNGDNGKATIEKLACALRPSEPPTLDTVLKCISGPGHKSATREYL KTLDKKSTVTQEDLNQLRKLADEDARNCRKKVGKKGKKPWADEVLKDVE NSCELTYLQDNSPARHREFSVMLDHAARRVSMAHSWIKKAEQRRRQFESDA QKLKNLQERAPSAVEWLDRFCESRSMTTGANTGSGYRIRKRAIEGWSYVVQ AWAEASCDTEDKRIAAARKVQADPEIEKFGDIQLFEALAADEAICVWRDQEG TQNPSILIDYVTGKTAEHNQKRFKVPAYRHPDELRHPVFCDFGNSRWSIQFAI HKEIRDRDKGAKQDTRQLQNRHGLKMRLWNGRSMTDVNLHWSSKRLTADL ALDQNPNPNPTEVTRADRLGRAASSAFDHVKIKNVFNEKEWNGRLQAPRAE LDRIAKLEEQGKTEQAEKLRKRLRWYVSFSPCLSPSGPFIVYAGQHNIQPKRS GQYAPHAQANKGRARLAQLILSRLPDLRILSVDLGHRFAAACAVWETLSSDA FRREIQGLNVLAGGSGEGDLFLHVEMTGDDGKRRTVVYRRIGPDQLLDNTP HPAPWARLDRQFLIKLQGEDEGVREASNEELWTVHKLEVEVGRTVPLIDRM VRSGFGKTEKQKERLKKLRELGWISAMPNEPSAETDEKEGEIRSISRSVDELM SSALGTLRLALKRHGNRARIAFAMTADYKPMPGGQKYYFHEAKEASKNDDE TKRRDNQIEFLQDALSLWHDLFSSPDWEDNEAKKLWQNHIATLPNYQTPEEI SAELKRVERNKKRKENRDKLRTAAKALAENDQLRQHLHDTWKERWESDDQ QWKERLRSLKDWIFPRGKAEDNPSIRHVGGLSITRINTISGLYQILKAFKMRP EPDDLRKNIPQKGDDELENFNRRLLEARDRLREQRVKQLASRIIEAALGVGRI KIPKNGKLPKRPRTTVDTPCHAVVIESLKTYRPDDLRTRRENRQLMQWSSAK VRKYLKEGCELYGLHFLEVPANYTSRQCSRTGLPGIRCDDVPTGDFLKAPW WRRAINTAREKNGGDAKDRFLVDLYDHLNNLQSKGEALPATVRVPRQGGNL FIAGAQLDDTNKERRAIQADLNAAANIGLRALLDPDWRGRWWYVPCKDGT SEPALDRIEGSTAFNDVRSLPTGDNSSRRAPREIENLWRDPSGDSLESGTWSPT RAYWDTVQSRVIELLRRHAGLPTS（配列番号71）
LsCas12b *Laceyella sacchari* WP_132221894.1	MSIRSFKLKLKTKSGVNAEQLRRGLWRTHQLINDGIAYYMNWLVLLRQEDL FIRNKETNEIEKRSKEEIQAVLLERVHKQQQRNQWSGEVDEQTLLQALRQLY EEIVPSVIGKSGNASLKARFFLGPLVDPNNKTTKDVSKSGPTPKWKKMKDAG DPNWVQEYEKYMAERQTLVRLEEMGLIPLFPMYTDEVGDIHWLPQASGYTR TWDRDMFQQAIERLLSWESWNRRVRERRAQFEKKTHDFASRFSESDVQWM NKLREYEAQQEKSLEENAFAPNEPYALTKKALRGWERVYHSWMRLDSAASE EAYWQEVATCQTAMRGEFGDPAIYQFLAQKENHDIWRGYPERVIDFAELNHL QRELRRAKEDATFTLPDSVDHPLWVRYEAPGGTNIHGYDLVQDTKRNLTLIL DKFILPDENGSWHEVKKVPFSLAKSKQFHRQVWLQEEQKQKKREVVFYDYS TNLPHLGTLAGAKLQWDRNFLNKRTQQQIEETGEIGKVFFNISVDVRPAVEV KNGRLQNGLGKALTVLTHPDGTKIVTGWKAEQLEKWVGESGRVSSLGLDSL SEGLRVMSIDLGQRTSATVSVFEITKEAPDNPYKFFYQLEGTEMFAVHQRSFL LALPGENPPQKIKQMREIRWKERNRIKQQVDQLSAILRLHKKVNEDERIQAID KLLQKVASWQLNEEIATAWNQALSQLYSKAKENDLQWNQAIKNAHHQLEPV VGKQISLWRKDLSTGRQGIAGLSLWSIEELEATKKLLTRWSKRSREPGVVKRI ERFETFAKQIQHHHINQVKENRLKQLANLIVMTALGYKYDQEQKKWIEVYPA CQVVLFENLRSYRFSFERSRRENKKLMEWSHRSIPKLVQMQGELFGLQVADV YAAYSSRYHGRTGAPGIRCHALTEADLRNETNIIHELIEAGFIKEEHRPYLQQG DLVPWSGGELFATLQKPYDNPRILTLHADINAAQNIQKRFWHPSMWFRVNCE SVMEGEIVTYVPKNKTVHKKQGKTFRFVKVEGSDVYEWAKWSKNRNKNTF

【表１３－６】

	SSITERKPPSSMILFRDPSGTFFKEQEWVEQKTFWGKVQSMIQAYMKKTIVQ RMEE（配列番号72）
DtCas12b *Dsulfonatronum thiodismutans* *WP_031386437*	MVLGRKDDTAELRRALWTTHEHVNLAVAEVERVLLRCRGRSYWTLDRRGD PVHVPESQVAEDALAMAREAQRRNGWPVVGEDEEILLALRYLYEQIVPSCLL DDLGKPLKGDAQKIGTNYAGPLFDSDTCRRDEGKDVACCGPFHEVAGKYLG ALPEWATPISKQEFDGKDASHLRFKATGGDDAFFRVSIEKANAWYEDPANQD ALKNKAYNKDDWKKEKDKGISSWAVKYIQKQLQLGQDPRTEVRRKLWLEL GLLPLFIPVFDKTMVGNLWNRLAVRLALAHLLSWESWNHRAVQDQALARA KRDELAALFLGMEDGFAGLREYELRRNESIKQHAFEPVDRPYVVSGRALRS WTRVREEWLRHGDTQESRKNICNRLQDRLRGKFGDPDVFHWLAEDGQEAL WKERDCVTSFSLLNDADGLLEKRKGYALMTFADARLHPRWAMYEAPGGSN LRTYQIRKTENGLWADVVLLSPRNESAAVEEKTFNVRLAPSGQLSNVSFDQIQ KGSKMVGRCRYQSANQQFEGLLGGAEILFDRKRIANEQHGATDLASKPGHV WFKLTLDVRPQAPQGWLDGKGRPALPPEAKHFKTALSNKSKFADQVRPGLR VLSVDLGVRSFAACSVFELVRGGPDQGTYFPAADGRTVDDPEKLWAKHERSF KITLPGENPSRKEEIARRAAMEELRSLNGDIRRLKAILRLSVLQEDDPRTEHLR LFMEAIVDDPAKSALNAELFKGFGDDRFRSTPDLWKQHCHFFHDKAEKVVA ERFSRWRTETRPKSSSWQDWRERRGYAGGKSYWAVTYLEAVRGLILRWNMR GRTYGEVNRQDKKQFGTVASALLHHINQLKEDRIKTGADMIIQAARGFVPRK NGAGWVQVHEPCRLILFEDLARYRFRTDRSRRENSRLMRWSHREIVNEVGM QGELYGLHVDTTEAGFSSRYLASSGAPGVRCRHLVEEDFHDGLPGMHLVGE LDWLLPKDKDRTANEARRLLGGMVRPGMLVPWDGGELFATLNAASQLHVI HADINAAQNLQRRFWGRCGEAIRIVCNQLSVDGSTRYEMAKAPKARLLGAL QQLKNGDAPFHLTSIPNSQKPENSYVMTPTNAGKKYRAGPGEKSSGEEDELA LDIVEQAEELAQGRKTFFRDPSGVFFAPDRWLPSEIYWSRIRRRIWQVTLERN SSGRQERAEMDEMPY（配列番号73）

【０３９９】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、ガイドヌクレオチド配列によってプログラム可能なDNA結合タンパク質ドメインとして用いられ得るCas12a(Cpf1)(dCpf1)バリアントをもまた含み得る。Cas12a(Cpf1)タンパク質は、Cas9のRuvCドメインに類似であるRuvC様エンドヌクレアーゼドメインを有するが、HNHエンドヌクレアーゼドメインは有さず、Cas12a(Cpf1)のN末端はCas9のアルファヘリックス系の認識ローブを有さない。Zetsche et al.,Cell,163,759-771,2015(これは参照によって本願に組み込まれる)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。

【０４００】

いくつかの態様では、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、限定なしに、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つの別物のクラス2 CRISPR-Casシステム(Cas12b1、Cas13a、およびCas12c)がShmakov et al.,"Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR Cas Systems",Mol.Cell,2015 Nov 5;60(3):385-397によって記載されている。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。

【０４０１】

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(predicated)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分解活性とは別物の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プロセシング挙動とは異なる。例えば、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を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。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持つ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。例えば、Abudayyeh et al.,"C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector",Science,2016 Aug 5;353(6299)を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。

【０４０２】

Alicyclobaccillus acidoterrastris Cas12b1(AacC2c1)の結晶構造がキメラ単分子ガイドRNA(sgRNA)との複合体として報告されている。例えば、Liu et al.,"C2c1-sgRNA Complex Structure Reveals RNA-Guided DNA Cleavage Mechanism",Mol.Cell,2017 Jan 19;65(2):310-322を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。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。例えば、Yang et al.,"PAM-dependent Target DNA Recognition and Cleavage by C2C1 CRISPR-Cas endonuclease",Cell,2016 Dec 15;167(7):1814-1828を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。AacC2c1の触媒的に有能な立体配座は、独立して単一のRuvC触媒ポケット内に位置取った標的および非標的DNA鎖両方によって、キャプチャされている。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。

【０４０３】

いくつかの態様では、napDNAbpはC2c1、C2c2、またはC2c3タンパク質であり得る。いくつかの態様では、napDNAbpはC2c1タンパク質である。いくつかの態様では、napDNAbpはCas13aタンパク質である。いくつかの態様では、napDNAbpはCas12cタンパク質である。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、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。

【０４０４】

H．<u>Cas9循環置換体</u>

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子はCas9の循環置換体を含み得る。

【０４０５】

用語「循環置換Cas9」またはCas9の「循環置換体」または「CP-Cas9」は、循環置換体バリアントとして生起するかまたは操作されるように改変されているいずれかのCas9タンパク質またはそのバリアントを言う。これは、Cas9タンパク質(例えば、野生型C

as9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ということを意味する。かかる循環置換Cas9タンパク質またはそれらのバリアントは、ガイドRNA(gRNA)と複合体化したときにDNAに結合する能力を保持する。Oakes et al.,"Protein Engineering of Cas9 for enhanced function,"Methods Enzymol,2014,546:491-511およびOakes et al.,"CRISPR-Cas9 Circular Permutants as Programmable Scaffolds for Genome Modification,"Cell,January 10,2019,176:254-267を見よ。夫々は参照によって本願に組み込まれる。もたらされる循環置換タンパク質がガイドRNA(gRNA)と複合体化したときに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。

【０４０６】

いずれかのバリアント、オーソログ、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、循環置換体バリアントとして再構成され得る。

【０４０７】

種々の態様において、Cas9の循環置換体は次の構造を有し得る:N末端-[元のC末端]-[任意のリンカー]-[元のN末端]-C末端。

【０４０８】

例として、本開示は標準的なS.pyogenes Cas9の次の循環置換体を企図する(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸(付番は配列番号18のアミノ酸位置に基づく)):

N末端-[1268～1368]-[任意のリンカー]-[1～1267]-C末端;
N末端-[1168～1368]-[任意のリンカー]-[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;
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;もしくは
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(他のCas9オーソログ、バリアントなどを包含する)の対応する循環置換体。

【０４０９】

具体的な態様では、循環置換体(circular permuant)Cas9は次の構造を有する(S.pyogenes Cas9(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸(付番は配列番号18のアミノ酸位置に基づく)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;
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;もしくは
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(他のCas9オーソログ、バリアントなどを包含する)の対応する循環置換体。

【０４１０】

なお他の態様において、循環置換体(circular permuant)Cas9は次の構造を有する(S.pyogenes Cas9(UniProtKB-Q99ZW2(CAS9_STRP1)の1368アミノ酸(付番は配

列番号18のアミノ酸位置に基づく)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;
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;もしくは
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(他のCas9オーソログ、バリアントなどを包含する)の対応する循環置換体。

【0411】

いくつかの態様では、循環置換体は、直接的にまたはアミノ酸リンカーなどのリンカーを用いることによってどちらかで、Cas9のC末端フラグメントをCas9のN末端フラグメントに連結することによって形成され得る。いくつかの態様では、C末端フラグメントは、Cas9のアミノ酸(例えば、アミノ酸約1300-1368)のC末端95%以上、あるいはCas9(例えば、配列番号77-86のいずれか1つ)のC末端90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、もしくは5%、またはより多くに対応し得る。N末端部分は、Cas9のアミノ酸(例えば、アミノ酸約1-1300)のN末端95%以上、あるいはCas9の(例えば配列番号18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%、またはより多くに対応し得る。

【0412】

いくつかの態様では、循環置換体は、直接的にまたはアミノ酸リンカーなどのリンカーを用いることによってどちらかで、Cas9のC末端フラグメントをCas9のN末端フラグメントに連結することによって形成され得る。いくつかの態様では、N末端へと再配置されるC末端フラグメントは、Cas9のアミノ酸のC末端30%以下(例えば、配列番号18のアミノ酸1012～1368)を包含するかまたはそれらに対応する。いくつかの態様では、N末端へと再配置されるC末端フラグメントは、Cas9のアミノ酸(例えば、配列番号18のCas9)のC末端30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、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。いくつかの態様では、N末端へと再配置されるC末端フラグメントは、Cas9(例えば、配列番号18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。いくつかの態様では、N末端へと再配置されるC末端部分は、Cas9(例えば、配列番号18のCas9)のC末端410、400、390、380、370、360、350、340、330、320、310、300、290、280、270、260、250、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。いくつかの態様では、N末端へと再配置されるC末端フラグメントは、Cas9(例えば、配列番号18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。

【0413】

他の態様において、循環置換体Cas9バリアントは、次の方法に基づくCas9一次構造のトポロジー的再配置として定められ得、これは配列番号18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循環置換体(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末端領域に先立つ(preceed)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(例えば、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られ得る。例えば、CP部位は、(配列番号18のS.pyogenes Cas9に対して相対的に)元のアミノ酸残基181、199、230、270、310、1010、1016、1023、1029、1041、1247、1249、または

1282に位置付けられ得る。それゆえに、ひとたびN末端に位置替えされると、元のアミノ酸181、199、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タンパク質の命名体系は、夫々Cas9-CP^{181}、Cas9-CP^{199}、Cas9-CP^{230}、Cas9-CP^{270}、Cas9-CP^{310}、Cas9-CP^{1010}、Cas9-CP^{1016}、Cas9-CP^{1023}、Cas9-CP^{1029}、Cas9-CP^{1041}、Cas9-CP^{1247}、Cas9-CP^{1249}、およびCas9-CP^{1282}と言われ得る。この記載は配列番号18からのCPバリアントを作ることに限定されることを意味されず、いずれかのCas9配列において、これらの位置に対応するCP部位においてまたは全く(entireley)他のCP部位においてどちらかでCPバリアントを作るために実装され得る。この記載は決して特定のCP部位を限定することを意味されない。実質的にいずれかのCP部位がCP-Cas9バリアントを形成するために用いられ得る。

【０４１４】

配列番号18のCas9に基づく例示のCP-Cas9アミノ酸配列が下で提供される。これにおいては、リンカー配列は下線付きによって指示され、任意のメチオニン(M)残基は太字で指示されている。本開示はリンカー配列を包含しないかまたは異なるリンカー配列を包含するCP-Cas9配列を提供するということは了解されるはずである。CP-Cas9配列が配列番号18以外のCas9配列に基づき得るということは了解されるはずであり、本願において提供されるいずれかの例は限定することを意味されない。例示のCP-Cas9配列は次のとおりである:

【表１４－１】

CP名	配列	配列番号
CP1012	DYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLAN GEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKK TEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVA YSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEA KGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNEL ALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDE IIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLF TLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYE TRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGDKKYSIGLAIGT NSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG ETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFI QLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYD DDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAP LSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGY	配列番号77

【表１４－２】

CP名	配列	配列番号
	AGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFR IPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQ SFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTE GMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIEC FDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILED IVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWG RLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDEL VKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDIN RLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAG FIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITL KSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKK YPKLESEFVYG	
CP1028	EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGSG GSGGSGGSGGSGGSGGMDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYK VPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKK HERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYL ALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEEN PINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIA LSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHL GELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNL PNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQ KKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRF NASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDK QSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ GDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWR QLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQI TKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDF QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGD YKVYDVRKMIAKSEQ	配列番号78
CP1041	NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVR KVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDW DPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIM ERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKR	配列番号79

【表１４－３】

CP名	配列	配列番号
	MLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKE VLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGGSGG GSGGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQ EIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLI EGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILS ARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFD LAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETI TPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLY EYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKI IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFD DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSD GFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNK VLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRM NTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYH HAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA KSEQEIGKATAKYFFYS	
CP1249	PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLS AYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRY TSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGGS GGSGGSGG**M**DKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN RICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGN IVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKF RGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD AKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPN FKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKA LVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILE KMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILR RQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYH DLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYA HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF LKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA NLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAREN QTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSI DNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT	配列番号80

【表１４－４】

CP名	配列	配列番号
	QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREIN NYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIET NGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSK ESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKD LIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL YLASHYEKLKGS	
CP1300	KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGSGGSGGSGGSGGSGGS GGDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRH SIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEI FSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY HEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSA RLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDL AEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLP EKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTE ELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYP FLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITP WNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKV TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIK DKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDK VMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSP AIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDN LTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTK YDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHA HDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSE QEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRD	配列番号81

【０４１５】

Cas9循環置換体は本明細書に記載の多重フラッププライム編集構築物に有用であり得る。Cas9のN末端へと再配置され得る配列番号１８のCas9に基づくCas9の例示のC末端フラグメントが、下で提供される。Cas9のかかるC末端フラグメントは例示的であり、限定することを意味されないということは了解されるはずである。これらの例示のCP-Cas9フラグメントは次の配列を有する:

【表１５】

CP名	配列	配列番号
CP1012 C末端フラグメント	DYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号82
CP1028 C末端フラグメント	EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号83
CP1041 C末端フラグメント	NIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号84
CP1249 C末端フラグメント	PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号85
CP1300 C末端フラグメント	KPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号86

【０４１６】

I．改変されたPAM特異性を有するCas9バリアント

本開示の多重フラッププライム編集因子は、改変されたPAM特異性を有するCas9バリアントをもまた含み得る。本開示のいくつかの側面は、標準的なPAM(5'-NGG-3'。ここで、NはA、C、G、またはTである)をその3'端に含まない標的配列に対して活性を発揮するCas9タンパク質を提供する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NGG-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NNG-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NNA-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NNC-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NNT-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NGT-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NGA-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NGC-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAA-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAC-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAT-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。なお他の態様において、Cas9タンパク質は、5'-NAG-3'PAM配

列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する。

【０４１７】

第1のアミノ酸残基(例えばA)から第2のアミノ酸残基(例えばT)への本明細書に記載のアミノ酸変異のいずれか(例えば、A262T)は、第1のアミノ酸残基から(例えば、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変異をもまた包含し得る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(例えば、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)の変異は、異なる疎水性側鎖を有する第2のアミノ酸(例えば、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)への変異であり得る。例えば、アラニンからトレオニンへの変異(例えばA262T変異)は、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、例えばセリンへの変異でもまたあり得る。別の例として、正荷電側鎖を有するアミノ酸(例えば、アルギニン、ヒスチジン、またはリジン)の変異は、異なる正荷電側鎖を有する第2のアミノ酸(例えば、アルギニン、ヒスチジン、またはリジン)への変異であり得る。別の例として、極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン)の変異は、異なる極性側鎖を有する第2のアミノ酸(例えば、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン)への変異であり得る。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、かかる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。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からトレオニンへの本願において提供されるアミノ酸変異のいずれかのアミノは、セリンへのアミノ酸変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からアルギニンへの本願において提供されるアミノ酸変異のいずれかのアミノは、リジンへのアミノ酸変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からイソロイシンへの本願において提供されるアミノ酸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変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からリジンへの本願において提供されるアミノ酸変異のいずれかのアミノはアルギニンへのアミノ酸変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からアスパラギン酸への本願において提供されるアミノ酸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変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からバリンへの本願において提供されるアミノ酸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変異であり得る。いくつかの態様では、1つのアミノ酸からグリシンへの本願において提供されるアミノ酸変異のいずれかのアミノはアラニンへのアミノ酸変異であり得る。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は了解されるはずであり、他の保存されたアミノ酸残基へのアミノ酸変異のいずれかもまた本開示の範囲内である。

【０４１８】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAA-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する変異の組み合わせを含む。いくつかの態様では、変異の組み合わせは、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。いくつかの態様では、変異の組み合わせは、表1の列記されているクローンの保存的変異である。いくつかの態様では、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つの変異の組み合わせを含む。

【０４１９】

表1:NAA PAMクローン

【表１６－１】

野生型 SpCas9（例として、配列番号18）からの突然変異
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
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

【表１６－２】

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、N1317T、A1320V、A1323D、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、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
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

【０４２０】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、表1のバリアントのいずれか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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、表1のバリアントのいずれか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。

【０４２１】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、配列番号18によって提供されるStreptococcus pyogenes Cas9と比較して、標準的なPAM(5'-NGG-3')をその3'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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、標準的なPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない3'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18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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、標準的な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2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。いくつかの態様では、標的配列の3'端はAAA、GAA、CAA、またはTAA配列に直接的に隣接する。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAC-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する変異の組み合わせを含む。いくつかの態様では、変異の組み合わせは、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。いくつかの態様では、変異の組み合わせは、表2の列記されているクローンの保存的変異である。いくつかの態様では、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つの変異の組み合わせを含む。

【０４２２】

表2:NAC PAMクローン

【表１７－１】

野生型 SPCAS9(例として、配列番号18)からの突然変異
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
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

【表１７－２】

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

【０４２３】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、表2のバリアントのいずれか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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、表2のバリアントのいずれか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。

【０４２４】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、配列番号18によって提供されるStreptoc

occus pyogenes Cas9と比較して、標準的なPAM(5'-NGG-3')をその3'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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、標準的なPAM配列(5'-NGG-3')に直接的に隣接しない3'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18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。いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、標準的な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18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。いくつかの態様では、標的配列の3'端はAAC、GAC、CAC、またはTAC配列に直接的に隣接する。

【０４２５】

いくつかの態様では、Cas9タンパク質は、5'-NAT-3'PAM配列をその3'端に含む標的配列に対して活性を発揮する変異の組み合わせを含む。いくつかの態様では、変異の組み合わせは表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。いくつかの態様では、変異の組み合わせは、表3の列記されているクローンの保存的変異である。いくつかの態様では、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つの変異の組み合わせを含む。

【０４２６】

表3:NAT PAMクローン

【表１８－１】

野生型 SPCAS9(例として、配列番号18)からの突然変異
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

【表１８－２】

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

【０４２７】

本開示の多重フラッププライム編集因子に関して用いられ得る種々のnapDNAbpの上の記載は、決して限定することを意味されない。多重フラッププライム編集因子は、公知であるか、または指向性進化的なもしくは別様の変異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標準的なSpCas9、またはいずれかのオーソログCas9タンパク質、またはいずれかのバリアントCas9タンパク質を含み得、Cas9のいずれかの天然に存在するバリアント、変異体、または別様に操作されたバージョンを包含する。種々の態様において、Cas9またはCas9バリアント(varant)はニッカーゼ活性を有し、すなわち標的DNA配列の1つの(of)鎖のみを切断する。他の態様において、Cas9またはCas9バリアント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。用いられ得る他のバリアントCas9タンパク質は、標準的なSpCas9よりも小さい分子量を有するか(例えば、より容易な送達のため)または改変もしくは再配置された一次アミノ酸構造(例えば、循環置換体フォーマット)を有するものである。本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、収斂進化の結果であるCas12a/Cpf1およびCas12bタンパク質を包含するCas9等価物をもまた含み得る。本願において用いられるnapDNAbp(例えば、SpCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物)は、それらのPAM特異性を変改/増強する種々の改変をもまた含有し得る。最後に、本願は、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％配列同一性を参照Cas9配列、例えば参照SpCas9標準的な配列または参照Cas9等価物(例えば、Cas12a/Cpf1)に対して有するいずれかのCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物を企図する。

【０４２８】

具体的な態様では、拡張されたPAM能力を有するCas9バリアントはSpCas9(H840A)VRQR(配列番号87)であり、これは次のアミノ酸配列を有する(配列番号51の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(show)。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１９－１】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE
GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD

【表１９－２】

QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA
RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKH
SLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI
LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELG
SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGD
YKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET
GEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD
WDPKKYGGF**V**SPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF
LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA**R**ELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA
YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK**Q**Y**R**STKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 87)

【０４２９】

別の具体的な態様では、拡張されたPAM能力を有するCas9バリアントは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51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２０－１】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGET
AEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHE
RHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE
GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGD
QYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDL
LRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA
RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKH
SLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKE
DYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLT
LFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIL
DFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI
LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELG
SQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFL
KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLT
KAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIT
LKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGD
YKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET
GEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKD
WDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDF

【表２０－２】

LEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASARELQKGNELALPSKYVNFL
YLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSA
YNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKEYRSTKEVLDATLIHQ
SITGLYETRIDLSQLGGD (配列番号 88)

【０４３０】

いくつかの態様では、非標準的な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。かかる核酸プログラム型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～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)を要求しない。ヌクレアーゼ不活性なNgAgo(dNgAgo)を用いることは、標的化され得る塩基を多大に拡張し得る。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):258-61;およびSwarts et al.,Nucleic Acids Res.43(10)(2015):5120-9に記載されている。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。

【０４３１】

いくつかの態様では、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 function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements",Biol Direct.2009 Aug 25;4:29.doi:10.1186/1745-6150-4-29に記載されている。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。いくつかの態様では、napDNAbpはMarinitoga piezophila Argunaute(MpAgo)タンパク質である。CRISPR関連Marinitoga piezophila Argunaute(MpAgo)タンパク質は

、5'-リン酸化されたガイドを用いて一本鎖標的配列を切断する。5'ガイドは全ての公知のアルゴノートによって用いられる。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標準的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。例えば、Kaya et al.,"A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity",Proc Natl Acad Sci U S A.2016 Apr 12;113(15):4057-62を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる)。他のargonauteタンパク質が用いられ得、本開示の範囲内であるということは了解されるはずである。

【０４３２】

本開示のいくつかの側面は、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、具体的な核酸領域に結合するためには標準的なNGG PAM配列を要求する。これはゲノム上の所望の塩基を編集する能力を限定し得る。いくつかの態様では、本願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得る。例えば、ここでは、標的塩基が4塩基領域(例えば、「編集窓」)上に置かれ、これがPAMのおよそ15塩基上流にある。Komor,A.C.,et al.,"Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage"Nature 533,420-424(2016)を見よ。これの内容全体は参照によってここに組み込まれる。従って、いくつかの態様では、本願において提供される融合タンパク質のいずれかは、標準的な(例えば、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できるCas9ドメインを含有し得る。非標準的なPAM配列に結合するCas9ドメインは当該技術分野において記載されており、当業者には明らかであろう。例えば、非標準的なPAM配列に結合するCas9ドメインは、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;夫々の内容全体は参照によってここに組み込まれる。

【０４３３】

例えば、変改されたPAM特異性を有するnapDNAbpドメイン、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74)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%配列同一性を有するドメイン:

【表２１－１】

MSIYQEFVNKYSLSKTLRFELIPQGKTLENIKARGLILDDEKRAKDYKKAKQIIDKY
HQFFIEEILSSVCISEDLLQNYSDVYFKLKKSDDDNLQKDFKSAKDTIKKQISEYIKD
SEKFKNLFNQNLIDAKKGQESDLILWLKQSKDNGIELFKANSDITDIDEALEIIKSFK
GWTTYFKGFHENRKNVYSSNDIPTSIIYRIVDDNLPKFLENKAKYESLKDKAPEAIN
YEQIKKDLAEELTFDIDYKTSEVNQRVFSLDEVFEIANFNNYLNQSGITKFNTIIGGK
FVNGENTKRKGINEYINLYSQQINDKTLKKYKMSVLFKQILSDTESKSFVIDKLEDD
SDVVTTMQSFYEQIAAFKTVEEKSIKETLSLLFDDLKAQKLDLSKIYFKNDKSLTDL
SQQVFDDYSVIGTAVLEYITQQIAPKNLDNPSKKEQELIAKKTEKAKYLSLETIKLA
LEEFNKHRDIDKQCRFEEILANFAAIPMIFDEIAQNKDNLAQISIKYQNQGKKDLLQ
ASAEDDVKAIKDLLDQTNNLLHKLKIFHISQSEDKANILDKDEHFYLVFEECYFELA
NIVPLYNKIRNYITQKPYSDEKFKLNFENSTLANGWDKNKEPDNTAILFIKDDKYYL
GVMNKKNNKIFDDKAIKENKGEGYKKIVYKLLPGANKMLPKVFFSAKSIKFYNPS
EDILRIRNHSTHTKNGSPQKGYEKFEFNIEDCRKFIDFYKQSISKHPEWKDFGFRFS
DTQRYNSIDEFYREVENQGYKLTFENISESYIDSVVNQGKLYLFQIYNKDFSAYSKG
RPNLHTLYWKALFDERNLQDVVYKLNGEAELFYRKQSIPKKITHPAKEAIANKNK
DNPKKESVFEYDLIKDKRFTEDKFFFHCPITINFKSSGANKFNDEINLLLKEKANDV
HILSIDRGERHLAYYTLVDGKGNIIKQDTFNIIGNDRMKTNYHDKLAAIEKDRDSAR
KDWKKINNIKEMKEGYLSQVVHEIAKLVIEYNAIVVFEDLNFGFKRGRFKVEKQV
YQKLEKMLIEKLNYLVFKDNEFDKTGGVLRAYQLTAPFETFKKMGKQTGIIYYVPA

【表２１－２】

GFTSKICPVTGFVNQLYPKYESVSKSQEFFSKFDKICYNLDKGYFEFSFDYKNFGDK
AAKGKWTIASFGSRLINFRNSDKNHNWDTREVYPTKELEKLLKDYSIEYGHGECIK
AAICGESDKKFFAKLTSVLNTILQMRNSKTGTELDYLISPVADVNGNFFDSRQAPKN
MPQDADANGAYHIGLKGLMLLGRIKNNQEGKKLNLVIKNEEYFEFVQNRNN (
配列番号74)

【０４３４】

変改されたPAM特異性を有する追加のnapDNAbpドメイン、例えば、次のアミノ酸配列を有する野生型Geobacillus thermodenitrificans Cas9(配列番号75)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%配列同一性を有するドメイン:

【表２２】

MKYKIGLDIGITSIGWAVINLDIPRIEDLGVRIFDRAENPKTGESLALPRRLARSARR
RLRRRKHRLERIRRLFVREGILTKEELNKLFEKKHEIDVWQLRVEALDRKLNNDEL
ARILLHLAKRRGFRSNRKSERTNKENSTMLKHIEENQSILSSYRTVAEMVVKDPKFS
LHKRNKEDNYTNTVARDDLEREIKLIFAKQREYGNIVCTEAFEHEYISIWASQRPFA
SKDDIEKKVGFCTFEPKEKRAPKATYTFQSFTVWEHINKLRLVSPGGIRALTDDERR
LIYKQAFHKNKITFHDVRTLLNLPDDTRFKGLLYDRNTTLKENEKVRFLELGAYHK
IRKAIDSVYGKGAAKSFRPIDFDTFGYALTMFKDDTDIRSYLRNEYEQNGKRMENL
ADKVYDEELIEELLNLSFSKFGHLSLKALRNILPYMEQGEVYSTACERAGYTFTGP
KKKQKTVLLPNIPPIANPVVMRALTQARKVVNAIIKKYGSPVSIHIELARELSQSFD
ERRKMQKEQEGNRKKNETAIRQLVEYGLTLNPTGLDIVKFKLWSEQNGKCAYSLQ
PIEIERLLEPGYTEVDHVIPYSRSLDDSYTNKVLVLTKENREKGNRTPAEYLGLGSER
WQQFETFVLTNKQFSKKKRDRLLRLHYDENEENEFKNRNLNDTRYISRFLANFIRE
HLKFADSDDKQKVYTVNGRITAHLRSRWNFNKNREESNLHHAVDAAIVACTTPSDI
ARVTAFYQRREQNKELSKKTDPQFPQPWPHFADELQARLSKNPKESIKALNLGNY
DNEKLESLQPVFVSRMPKRSITGAAHQETLRRYIGIDERSGKIQTVVKKKLSEIQLD
KTGHFPMYGKESDPRTYEAIRQRLLEHNNDPKKAFQEPLYKPKKNGELGPIIRTIKII
DTTNQVIPLNDGKTVAYNSNIVRVDVFEKDGKYYCVPIYTIDMMKGILPNKAIEPN
KPYSEWKEMTEDYTFRFSLYPNDLIRIEFPREKTIKTAVGEEIKIKDLFAYYQTIDSSN
GGLSLVSHDNNFSLRSIGSRTLKRFEKYQVDVLGNIYKVRGEKRVGVASSSHSKAG
ETIRPL (配列番号 75)

【０４３５】

いくつかの態様では、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)は、標準的な(NGG)PAM配列を要求しない核酸プログラム型DNA結合タンパク質である。いくつかの態様では、napDNAbpはargonauteタンパク質である。かかる核酸プログラム型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～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)を要求しない。ヌクレアーゼ不活性なNgAgo(dNgAgo)を用いることは、標的化され得る塩基を多大に拡張し得る。NgAgoの特徴付けおよび使用は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。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。Natronobacterium gregoryi Argonauteの配列は配列番号76によって提供される。

【０４３６】

開示される融合タンパク質は、次のアミノ酸配列を有する野生型Natronobacterium gregoryi Argonaute(配列番号76)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%配列同一性を有するnapDNAbpドメインを含み得る:

【表２３】

MTVIDLDSTTTADELTSGHTYDISVTLTGVYDNTDEQHPRMSLAFEQDNGERRYIT LWKNTTPKDVFTYDYATGSTYIFTNIDYEVKDGYENLTATYQTTVENATAQEVGTT DEDETFAGGEPLDHHLDDALNETPDDAETESDSGHVMTSFASRDQLPEWTLHTYT LTATDGAKTDTEYARRTLAYTVRQELYTDHDAAPVATDGLMLLTPEPLGETPLDLD CGVRVEADETRTLDYTTAKDRLLARELVEEGLKRSLWDDYLVRGIDEVLSKEPVLT CDEFDLHERYDLSVEVGHSGRAYLHINFRHRFVPKLTLADIDDDNIYPGLRVKTTY RPRRGHIVWGLRDECATDSLNTLGNQSVVAYHRNNQTPINTDLLDAIEAADRRVVE TRRQGHGDDAVSFPQELLAVEPNTHQIKQFASDGFHQQARSKTRLSASRCSEKAQA FAERLDPVRLNGSTVEFSSEFFTGNNEQQLRLLYENGESVLTFRDGARGAHPDETFS KGIVNPPESFEVAVVLPEQQADTCKAQWDTMADLLNQAGAPPTRSETVQYDAFSS PESISLNVAGAIDPSEVDAAFVVLPPDQEGFADLASPTETYDELKKALANMGIYSQ MAYFDRFRDAKIFYTRNVALGLLAAAGGVAFTTEHAMPGDADMFIGIDVSRSYPE DGASGQINIAATATAVYKDGTILGHSSTRPQLGEKLQSTDVRDIMKNAILGYQQVT GESPTHIVIHRDGFMNEDLDPATEFLNEQGVEYDIVEIRKQPQTRLLAVSDVQYDTP VKSIAAINQNEPRATVATFGAPEYLATRDGGGLPRPIQIERVAGETDIETLTRQVYLL SQSHIQVHNSTARLPITTAYADQASTHATKGYLVQTGAFESNVGFL（配列番号 76）

【０４３７】

加えて、いずれかの利用可能な方法が、バリアントまたは変異体Cas9タンパク質を得るかまたは構築するために利用され得る。本願において用いられる用語「変異」は、別の残基によるある配列、例えば核酸もしくはアミノ酸配列上の残基の置換、またはある配列上の1以上の残基の欠失もしくは挿入を言う。変異は、典型的には、元の残基、次に配列上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の。本願において提供されるアミノ酸置換(変異)を作るための種々の方法が当該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。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されない。変異は、タンパク質活性を縮減または廃止する変異の正常の結果である「機能喪失」変異を包含し得る。ほとんどの機能喪失変異は劣性である。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、この存在が変異の効果を補償するからである。変異は、「機能獲得」変異をもまた包摂する。これは、正常な条件下ではさも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、いくつもの帰結を有し得る。例えば、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、機能獲得変異は通常は優性である。

【０４３８】

変異は部位特異的変異導入を用いて参照Cas9タンパク質上に導入され得る。当該技術分野で公知の部位特異的変異導入のより古い方法は、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上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以上のミスマッチ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'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ホスト細菌に形質転換され、プラークが所望の変異についてスクリーニングされる。より最近では、部位特異的変異導入はPCR方法論を使用している。これらは一本鎖鋳型を要求しないという利点を有する。加えて、サブクローニングを要求しない方法が開発されている。PCRに基づく部位特異的変異導入が行われるときには、いくつかのイシュ

ー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変異の拡張を防止するために、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、セレクション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。そして第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、端を磨くステップを手続きに組み込むことが必要である。

【０４３９】

変異は、指向性進化プロセス、例えばファージによって補助される連続的進化(PACE)またはファージによって補助される非連続的進化(PANCE)によってもまた導入され得る。本願において用いられる用語「ファージによって補助される連続的進化(PACE)」は、ファージをウイルスベクターとして使用する連続的進化を言う。PACEテクノロジーの一般概念は、例えば、2010年3月11日にWO2010/028347として公開された2009年9月8日出願の国際PCT出願PCT/US2009/056194;2012年6月28日にWO2012/088381として公開された2011年12月22日出願の国際PCT出願PCT/US2011/066747;2015年5月5日登録のU.S.出願U.S.特許No.9,023,594、2015年9月11日にWO2015/134121として公開された2015年1月20日出願の国際PCT出願PCT/US2015/012022、および2016年10月20日にWO2016/168631として公開された2016年4月15日出願の国際PCT出願PCT/US2016/027795に記載されている。これらの夫々の内容全体は参照によって本願に組み込まれる。バリアントCas9はファージによって補助される非連続的進化(PANCE)によってもまた得られ得る。本願において用いられるこれは、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言う。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有する進化する「セレクションファージ」(SP)の連続フ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。連続フ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。

【０４４０】

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。

【０４４１】

J．分裂されたPE送達のための割られたnapDNAbpドメイン

種々の態様において、本明細書に記載のプライム編集因子は2以上のフラグメントとして細胞に送達され得、これらは、細胞内において、再構成されたプライム編集因子へとアセンブリされるようになる(受動的アセンブリによるか、または分裂インテイン配列を用いることなどの能動的アセンブリによる)。いくつかのケースでは、自己アセンブリは受動的であり得、これによって、2以上のプライム編集因子フラグメントは細胞内で共有結合的にまたは非共有結合的に会合してプライム編集因子を再構成する。他のケースでは、自己アセンブリはフラグメントの夫々に組み入れされた二量体化ドメインによって触媒され得る。二量体化ドメインの例は本明細書に記載の。なお他のケースでは、自己アセンブリは、プライム編集因子フラグメントの夫々に組み入れされた分裂インテイン配列によって触媒され得る。

【０４４２】

分裂されたPE送達は、異なる送達アプローチの種々のサイズ制約に対処するために有利であり得る。例えば、送達アプローチは、ウイルスに基づく送達方法、メッセンジャーRNAに基づく送達方法、またはRNPに基づく送達(リボヌクレオタンパク質に基づく送達)を包含し得る。そして、送達のこれらの方法の夫々は、プライム編集因子をより小さい

ピースへと割ることによって、より効率的および/または有効であり得る。ひとたび細胞内においては、より小さいピースは機能的なプライム編集因子へとアセンブリし得る。分裂の手段に依存して、割られたプライム編集因子フラグメントは非共有結合的様式または共有結合的様式で再アセンブリされてプライム編集因子を再形成し得る。1つの態様では、プライム編集因子は1以上の分裂部位において2以上のフラグメントへと分裂され得る。フラグメントは(分裂される以外は)未改変であり得る。ひとたびフラグメントが細胞に送達されると(例えば、リボヌクレオタンパク質複合体の直接的送達によるか、または核酸送達、例えばmRNA送達もしくはウイルスベクターに基づく送達による)、フラグメントは共有結合的にまたは非共有結合的に再会合してプライム編集因子を再構成し得る。別の態様では、プライム編集因子は1以上の分裂部位において2以上のフラグメントへと分裂され得る。フラグメントの夫々は二量体化ドメインを含むように改変され得、これによって、形成された各フラグメントは二量体化ドメインにカップリングされる。ひとたび細胞内に送達または発現されると、異なるフラグメントの二量体化ドメイン同士は会合し、互いに結合し、異なるプライム編集因子フラグメントを一緒に持って来て、機能的なプライム編集因子を再形成する。さらに別の態様では、プライム編集因子フラグメントは分裂インテインを含むように改変され得る。ひとたび細胞内に送達または発現されると、異なるフラグメントの分裂インテインドメイン同士は会合し、互いに結合し、次いでトランススプライシングを経過する。これが、フラグメントの夫々からの分裂インテインドメインの切除と、フラグメント間のペプチド結合の付随的形成とをもたらし、それによってプライム編集因子を復元する。

【０４４３】

1つの態様では、プライム編集因子は分裂インテインアプローチを用いて送達され得る。

【０４４４】

分裂部位の位置付けは、プライム編集因子上の残基のいずれか1以上のペアの間に、ならびにnapDNAbpドメイン、ポリメラーゼドメイン(例えば、RTドメイン)、napDNAbpドメインおよびポリメラーゼドメインを連結するリンカードメイン内を包含するその中のいずれかのドメイン上に、位置取り得る。

【０４４５】

図66に図示される1つの態様では、プライム編集因子(PE)はnapDNAbp上の分裂部位において割られる。

【０４４６】

ある態様において、napDNAbpは次のとおり配列番号18の標準的なSpCas9ポリペプチドである:

【表２４】

SpCas9 *Streptococcus pyogenes* M1 SwissProt 受託番号 Q99ZW2 野生型 1368 AA	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEE LLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKV MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQ EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号18

【０４４７】

ある態様において、SpCas9は、配列番号18の標準的なSpCas9の残基1および2、もしくは2および3、もしくは3および4、もしくは4および5、もしくは5および6、もしくは6および7、もしくは7および8、もしくは8および9、もしくは9および10の間に位置付けられた分裂部位において、または残基1～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～200、200～300、300～400、400～500、500～600、600～700、700～800、800～900、1000～1100、1100～1200、1200～1300、もしくは1300～1368の間のどこかに位置付けられた残基のいずれかの2つのペアの間において、2つのフラグメントへと分裂される。

【０４４８】

ある態様において、napDNAbpは、配列番号18の標準的なSpCas9の位置1～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～200、200～300、300～400、400～500、500～600、600～700、700～800、800～900、1000～1100、1100～1200、1200～1300、または1300～1368の間のどこかに位置付けられた残基のいずれか2つのペアに対応する残基のペアに位置付けられる分裂部位において、2つのフラグメントへと分裂される。

【０４４９】

ある態様において、SpCas9は、配列番号18の標準的なSpCas9の残基1および2、もしくは2および3、もしくは3および4、もしくは4および5、もしくは5および6、もしくは6および7、もしくは7および8、もしくは8および9、もしくは9および10の間に位置付けられた分裂部位において、または残基1～10、10～20、20～30、30～40、40～

50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～200、200～300、300～400、400～500、500～600、600～700、700～800、800～900、1000～1100、1100～1200、1200～1300、もしくは1300～1368の間のどこかに位置付けられた残基のいずれか2つのペアの間において、2つのフラグメントへと分裂される。ある態様において、分裂部位は、1以上のポリペプチド結合部位(すなわち、「分裂部位または分裂インテイン分裂部位」)に位置付けられ、分裂インテインに融合され、次いで、別個にコードされる融合タンパク質として細胞に送達される。ひとたび分裂インテイン融合タンパク質同士(すなわち、タンパク質の半分同士)が細胞内で発現されると、タンパク質はトランススプライシングを経過して、連結された分裂インテイン配列の付随的除去によって完全なまたは丸ごとのPEを形成する。

【0450】

例えば、図66に示されているとおり、N末端エクステインは第1の分裂インテイン(例えば、Nインテイン)に融合され得、C末端エクステインは第2の分裂インテイン(例えば、Cインテイン)に融合され得る。細胞内におけるNインテインおよびCインテインの自己会合、次にそれらの自己切除と丸ごとのプライム編集因子(PE)のN末端エクステインおよびC末端エクステイン部分の間のペプチド結合の付随的形成とによって、N末端エクステインはC末端エクステインに融合されるようになって、napDNAbpドメインおよびポリメラーゼドメイン(例えば、RTドメイン)を含む丸ごとのプライム編集因子融合タンパク質を再形成する。

【0451】

分裂インテインを用いる分裂されたPE送達戦略を利するためには、プライム編集因子は、1以上の分裂部位において割られて、プライム編集因子の少なくとも2つの別個の半分を生出することを必要とする。これらの夫々は、各半分が分裂インテイン配列に融合される場合には、細胞内で再連結され得る。

【0452】

ある態様において、プライム編集因子は単一の分裂部位において分裂される。ある種の他の態様において、プライム編集因子は2つの分裂部位、もしくは3つの分裂部位、もしくは4つの分裂部位、またはより多くにおいて分裂される。

【0453】

好ましい態様では、プライム編集因子は単一の分裂部位において分裂されて、プライム編集因子の2つの別個の半分を生出する。これらの夫々は分裂インテイン配列に融合され得る。

【0454】

例示の分裂インテインはSsp DnaEインテインであり、これは2つのサブユニットつまりDnaE-NおよびDnaE-Cを含む。2つの異なるサブユニットは別個の遺伝子つまりdnaE-nおよびdnaE-cによってコードされ、これらは夫々DnaE-NおよびDnaE-Cサブユニットをコードする。DnaEはSynechocytis sp. PCC6803の天然に存在する分裂インテインであり、夫々がDnaE-NまたはDnaE-Cどちらかとの融合体を含む2つの別個のタンパク質のトランススプライシングを導くことができる。

【0455】

追加の天然に存在するかまたは操作された分裂インテイン配列は当該技術分野で公知であるか、または本明細書に記載の丸ごとのインテイン配列もしくは当該技術分野で利用可能なものから作られ得る。分裂インテイン配列の例は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 Nostc punctiforme,FEBS Lett,580:1853-1858に見出され得る。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。追加の分裂インテイン配列は例えばWO2013/045632、WO2014/055782、WO2016/069774、およびEP2877490に見出され得る。これらの夫々の内容は参照によって本願に組み込まれる。

【０４５６】
加えて、トランス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.,[0076]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.Biolmol.NMR 14:105-114(1999);Scott,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:13638-13643(1999))、2つの不活性なフラグメントとして(as to)タンパク質を発現するための機会を提供し、これらは続いてライゲーションを経過して機能的な産物を形成する。例えば、2つの別個に発現された半分からの完全なPE融合タンパク質の形成について、図66および67に示されているとおりである。

【０４５７】
本明細書に記載の種々の態様では、連続的進化法(例えばPACE)が塩基編集因子の第1の部分を進化させるために用いられ得る。第1の部分は、単一の構成要素またはドメイン、例えばCas9ドメイン、デアミナーゼドメイン、またはUGIドメインを包含し得る。次いで、進化した部分および残りの未進化の部分両方を分裂インテインポリペプチドドメインと共に別個に発現することによって、別個に進化した構成要素またはドメインは、細胞内において塩基編集因子の残りの部分に融合され得る。第1の部分は、より幅広く、本明細書に記載の連続的進化方法を用いて進化させられることを望まれる塩基編集因子のいずれかの第1のアミノ酸部分を包含し得る。第2の部分は、この態様では、本願の方法を用いて進化させられない塩基編集因子の残りのアミノ酸部分を言うであろう。塩基編集因子の進化した第1の部分および第2の部分は、夫々が分裂インテインポリペプチドドメインと共に細胞によって発現され得る。細胞の天然のタンパク質スプライシング機序は、進化した第1の部分および未進化の第2の部分を再アセンブリして、単一の融合タンパク質の進化した塩基編集因子を形成するであろう。進化した第1の部分は、単一の融合タンパク質のNまたはC末端パーツどちらかを含み得る。類縁の様式で、第2の直交的なトランススプライシングインテインペアの使用は、進化した第1の部分が単一の融合タンパク質の内部のパーツを含むことを許し得る。

【０４５８】
それゆえに、細胞内における進化したおよび未進化の構成要素を含む完全な塩基編集因子の形成を容易化するために、本明細書に記載の塩基編集因子の進化したおよび未進化の構成要素のいずれかは、分裂インテインタグと共に発現され得る。

【０４５９】
タンパク質スプライシングプロセスの機序は多大に詳細に研究されており(Chong,et al.,J.Biol.Chem.1996,271,22159-22168;Xu,M-Q & Perler,F.B.EMBO Journal,1996,15,5146-5153)、保存されたアミノ酸がインテインおよびエクステインスプライシング点に見出されている(Xu,et al.,EMBO Journal,1994,13 5517-522)。本明細書に記載の構築物は、第1の遺伝子(例えば、塩基編集因子の進化した部分)の5'末端に融合されたインテイン配列を含有する。好適なインテイン配列は、タンパク質スプライシングエレメントを含有することが公知のタンパク質のいずれかから選択され得る。全ての公知のインテインを含有するデータベースはワールドワイドウェブ上に見出され得る(Perler,F.B.Nucleic Acids Research,1999,27,346-347)。インテイン配列は3'端において第2の遺伝子の5'端に融合される。ある種のオルガネラへのこの遺伝子の標的化のためには、ペプチドシグナルが遺伝子のコード配列に融合され得る。第2の遺伝子の後に、インテイン遺伝子配列は、同じ細胞における複数のタンパク質の発現のために所望の回数だけ繰り返され得る。マルチインテイン含有構築物では、異なるソースからのインテイン要素を用いることが有用であり得る。発現されるべき最後の遺伝子の配列の後には、転写終結配列が挿入されなければならない。1つの態様では、それがインテインからの

エクステインの切除を触媒すると共にエクステインのライゲーションを防止し得るようにして、改変されたインテインスプライシング単位がデザインされる。Pyrococcus種GB-D DNAポリメラーゼ上のC末端エクステインジャンクションの変異導入は、変改されたスプライシングエレメントを生ずることが見出された。これは、エクステインおよびインテインの切断を誘導するが、エクステインの続くライゲーションを防止する(Xu,M-Q & Perler,F.B.EMBO Journal,1996,15,5146-5153)。セリン538からアラニンまたはグリシンどちらかへの変異は、切断を誘導したが、ライゲーションを防止した。インテインへのC末端エクステインジャンクションにおけるアミノ酸の保存を原因として、他のインテインスプライシング単位における同等残基の変異もまたエクステインライゲーションを防止するはずである。エンドヌクレアーゼドメインを含有しない好ましいインテインは、Mycobacterium xenopi GyrAタンパク質である(Telenti,et al.J.Bacteriol.1997,179,6378-6382)。他は天然に見出されているか、またはインテインを含有するエンドヌクレアーゼからエンドヌクレアーゼドメインを除去することによって人工的に生出されている(Chong,et al.J.Biol.Chem.1997,272,15587-15590)。好ましい態様では、インテインは、それがスプライシング機能を果たすために必要とされる最小限の数のアミノ酸からなるようにして選択され、例えばMycobacterium xenopi GyrAタンパク質からのインテインである(Telenti,A.,et al.,J.Bacteriol.1997,179,6378-6382)。代替的な態様では、エンドヌクレアーゼ活性なしのインテインが選択され、例えばMycobacterium xenopi GyrAタンパク質からのインテイン、またはエンドヌクレアーゼドメインを除去するように改変されたSaccharaomyces cerevisiae VMAインテインである(Chong,1997)。インテインスプライシング単位のさらなる改変は、切断反応の反応速度が変改されることを許し得、スプライシング単位の遺伝子配列を単純に改変することによって、タンパク質用量がコントロールされることを許す。

【０４６０】

インテインは2つの別個に転写および翻訳される遺伝子によってコードされる2つのフラグメントとしてもまた存在し得る。これらのいわゆる分裂インテインは自己会合し、タンパク質スプライシング活性をトランスで触媒する。分裂インテインは多様なシアノバクテリアおよび古細菌において同定されているが(Caspi et al,Mol Microbiol.50:1569-1577(2003);Choi J.et al,J Mol Biol.556:1093-1106(2006.);Dassa B.et al,Biochemistry.46:322-330(2007.);Liu X. and Yang J.,J Biol Chem.275:26315-26318(2003);Wu H.et al.

【０４６１】

Proc Natl Acad Sci USA.£5:9226-9231(1998.);およびZettler J.et al,FEBS Letters.553:909-914(2009))、真核生物ではここまで見出されていない。最近、環境メタゲノムデータのバイオインフォマティクス分析は、新規のゲノム配置を有する26の異なる遺伝子座を明らかにした。各遺伝子座においては、保存された酵素コード領域が分裂インテインによって分断され、自立したエンドヌクレアーゼ遺伝子が、インテインサブドメインをコードするセクション間に挿入されている。それらのうち、5つの遺伝子座が完全にアセンブリされた:DNAヘリカーゼ(gp41-1、gp41-8);イノシン-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼ(IMPDH-1);およびリボヌクレオチドレダクターゼ触媒サブユニット(NrdA-2およびNrdJ-1)である。このばらばらになった遺伝子編成は主にファージに存在するように見える(Dassa et al,Nucleic Acids Research.57:2560-2573(2009))。

【０４６２】

分裂インテインNpu DnaEは、タンパク質トランススプライシング反応について報告された最も高い速度を有するとして特徴付けられた。加えて、Npu DnaEタンパク質スプライシング反応は、異なるエクステイン配列、6～37℃の温度、および最高で6Mの尿素の存在についてロバストかつ高収量と考慮される(Zettler J.et al,FEBS Letters.553:909-914(2009);Iwai I.et al,FEBS Letters 550:1853-1858(2006))。予想されたとおり、これらのインテインのNドメインにおけるCysl Ala変異が導入されたと

きには、当初のN→Sのアシルシフト、よってタンパク質スプライシングがブロックされた。残念ながら、C末端切断反応もまたほとんど完全に阻害された。N末端の切れやすいペプチド結合におけるアシルシフトに対するC末端スプライスジャンクションにおけるアスパラギン環化の依存性は、天然に分裂されたDnaEインテインアレルに普通の固有の特性であるように見える(Zettler J.et al.FEBS Letters.555:909-914(2009))。

【０４６３】

タンパク質スプライシングの機序は、典型的には4つのステップを有する[29-30]:1)インテインN末端におけるN-SまたはN-Oアシルシフト。これは上流のペプチド結合を切断し、Nエクステインとインテインの第1のアミノ酸(CysまたはSer)の側鎖との間にエステル結合を形成する;2)Nエクステインをインテイン C末端へと位置替えするトランスエステル化。新たなエステル結合を形成し、NエクステインをCエクステインの第1のアミノ酸(Cys、Ser、またはThr)の側鎖に連結する;3)インテインおよびCエクステインの間のペプチド結合を切断するAsn環化;ならびに4)NエクステインおよびCエクステインの間においてペプチド結合によってエステル結合を置き換えるS-NまたはO-Nアシルシフト。

【０４６４】

分裂インテイ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[31]。分裂インテインは本質的には一続きのインテイン(例えばミニインテイン)であり、夫々Nインテインおよび Cインテインという名称の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、一続きのインテイ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。分裂インテインは天然に見出され、実験室でもまた操作されている[31-35]。本願において用いられる用語「分裂インテイン」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インを言い、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イ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インまたはそのフラグメントが、本発明の方法への使用のための分裂インテインを導出するために用いられ得る。例えば、一側面において、分裂インテインは真核生物インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは細菌インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは古細菌インテインに由来し得る。好ましくは、そのように導出された分裂インテインは、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。

【０４６５】

本願において用いられる「N末端分裂インテイン(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イン配列を言う。Inは、それゆえに、トランススプライシングが生起するとき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イン配列のN末端部分の改変である配列を含み得る。例えば、かかる追加のおよび/または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よび/または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。

【０４６６】

本願において用いられる「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言う。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したインテイン最後のβ鎖からである。Icは、それゆえに、トランススプライシングが生起するとき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、かかる追加のおよび/または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。

【０４６７】

本発明のいくつかの態様では、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)」が存在するときには、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。本願において用いられる「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ときに留まる分裂インテインのアミノ酸配列の部分を言う。ある態様において、InはISPを含む。別の態様では、IcはISPを含む。さらに別の態様では、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。

【０４６８】

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生出され得る[25-28]。分裂の生出が、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ーが存在し得る。

【０４６９】

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(例えばマイクロモル)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。

【０４７０】

[2]他のプログラム可能なヌクレアーゼ

本明細書に記載の種々の態様において、多重フラッププライム編集因子はCas9タンパク質などのnapDNAbpを含む。これらのタンパク質は、それらがガイドRNA(または場合に応じてPEgRNA)と複合体化するようになることによって「プログラム可能」である。これは、gRNA(またはPEgRNA)のスペーサー部分に対して相補的である配列を所有し、かつ要求されるPAM配列をもまた所有するDNA上の標的部位へとCas9タンパク質をガイドする。しかしながら、ここで想定されるある態様において、napDNAbpは、異なる型のプログラム可能なタンパク質、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼまたは転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)によって置換され得る。

【０４７１】

図1Jは、napDNAbp(例えばSpCas9ニッカーゼ)をいずれかのプログラム可能なヌクレアーゼドメイン、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)によって置き換える本願において企図されるプライム編集のかかるバリエーションを図示する。そのため、好適なヌクレアーゼは必ずしも核酸標的化分子(例えばガイドRNA)によって「プログラム」されることを必要とせず、むしろ、DNA結合ドメイン、例えば特にヌクレアーゼの特異性を定めることによってプログラムされ得るということが企図される。ちょうどnapDNAbp部分によるプライム編集のように、かかる代替的なプログラム可能なヌクレアーゼは、標的DNAの1つの鎖のみが

カットされるようにして改変されるということが好ましい。換言すると、プログラム可能なヌクレアーゼは好ましくはニッカーゼとして機能するべきである。ひとたびプログラム可能なヌクレアーゼが選択されると(例えば、ZFNまたはTALEN)、次いで、それがプライム編集様機序に従って作動することを許すように、追加の機能性がシステム上に操作され得る。例えば、プログラム可能なヌクレアーゼは(例えば、化学的リンカーを介して)RNAまたはDNA伸長アームをそれにカップリングすることによって改変され得、伸長アームはプライマー結合部位(PBS)およびDNA合成鋳型を含む。プログラム可能なヌクレアーゼは(例えば、化学的またはアミノ酸リンカーを介して)ポリメラーゼにもまたカップリングされ得る。これの性質は、伸長アームがDNAまたはRNAであるかどうかに依存するであろう。RNA伸長アームのケースでは、ポリメラーゼはRNA依存性DNAポリメラーゼであり得る(例えば逆転写酵素)。DNA伸長アームのケースでは、ポリメラーゼはDNA依存性DNAポリメラーゼであり得る(例えば、Pol I、Pol II、もしくはPol IIIを包含する原核生物ポリメラーゼ、またはPol a、Pol b、Pol g、Pol d、Pol e、もしくはPol zを包含する真核生物ポリメラーゼ)。システムは、丸ごととしての反応を容易化するために、プログラム可能なヌクレアーゼへの融合体として追加またはトランスで追加される他の機能性をもまた包含し得る(例えば、(a)カットされた部位においてDNAをほどいて、プライマーとして利用可能な3’端を有するカットされた鎖を作るためのヘリカーゼ、(b)カットされた鎖上の内生鎖を除去することを助けて、合成された鎖による内生鎖の置き換えの方に反応を駆動するためのFEN1、または(c)非編集鎖の有利な細胞性修復によって合成修復の取り入れを駆動することを助け得る、対向する鎖上の第2部位ニックを生出するためのnCas9:gRNA複合体)。napDNAbpによるプライム編集と類縁の様式で、別様にプログラム可能なヌクレアーゼによるかかる複合体は、目当ての編集を持つDNAの新たに合成された置き換え鎖を合成し、次いで永久的にDNAの標的部位上に組み入れるために用いられ得る。

【０４７２】

好適な代替的なプログラム可能なヌクレアーゼは当該技術分野で周知であり、これらは、DNAの標的部位に選択的に結合するようにプログラムされ得る代替的なプライム編集因子システムを構築するために、napDNAbp:gRNA複合体の代わりに用いられ得る。かつ、これらは、ポリメラーゼとプライマー結合部位およびDNA合成鋳型を含むRNAまたはDNA伸長アームとを特定のニック部位へと共局在させるために、上に記載されている様式でさらに改変され得る。例えば、図1Jによって表されるとおり、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)が、プログラム可能なヌクレアーゼとして、本明細書に記載の多重フラッププライム編集法および組成物に用いられ得る。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって生成される人工の制限酵素である。これらの試薬は効率的な、プログラム可能な、かつ特異的なDNA切断を可能化し、in situのゲノム編集のための強力なツールを表す。転写活性化因子様エフェクター(TALE)は、事実上いずれかのDNA配列に結合するように迅速に操作され得る。本願において用いられる用語TALENは幅広く、別のTALENからの補助なしに二本鎖DNAを切断し得るモノマーTALENを包含する。用語TALENは、同じ部位においてDNAを切断するために一緒に働くように操作されているTALENのペアの1つまたは両方のメンバーを言うためにもまた用いられる。一緒に働くTALENは左TALENおよび右TALENと言われ得る。これはDNAの掌性を参照している。米国第12/965,590号;米国第13/426,991号(米国特許第8,450,471号);米国第13/427,040号(米国特許第8,440,431号);米国第13/427,137号(米国特許第8,440,432号);および米国第13/738,381号を見よ。これらの全てはそれらの全体が参照によって本願に組み込まれる。加えて、TALENはWO2015/027134、US 9,181,535、Boch et al.,"Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors",Science,vol.326,pp.1509-1512(2009),Bogdanove et al.,TAL Effectors:Customizable Proteins for DNA Targeting,Science,vol.333,pp.1843-1846(2011),Cade et al.,"Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using hom

o- and heterodimeric TALENs",Nucleic Acids Research,vol.40,pp.8001-8010(2012),およびCermak et al.,"Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting",Nucleic Acids Research,vol.39,No.17,e82(2011)に記載されている。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。

【０４７３】

図1Jに表されているとおり、ジンクフィンガーヌクレアーゼもまた、多重フラッププライム編集への使用のための代替的なプログラム可能なヌクレアーゼとして、Cas9ニッカーゼなどのnapDNAbpの代わりに用いられ得る。TALENのように、ZFNタンパク質は、それらがニッカーゼとして機能するようにして改変され得る。すなわち、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子に用いられるnapDNAbpと類似の様式で、それが標的DNAの1つの鎖のみを切断するようにして、ZFNを操作する。ZFNタンパク質は、当該技術分野において、例えば、Carroll et al.,"Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases,"Genetics,Aug 2011,Vol.188:773-782;Durai et al.,"Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells,"Nucleic Acids Res,2005,Vol.33:5978-90;およびGaj et al.,"ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,"Trends Biotechnol.2013,Vol.31:397-405(こ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)に広範囲に記載されている。

【０４７４】

[3]ポリメラーゼ(例えば逆転写酵素)

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子システムはポリメラーゼ(例えば、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)またはそのバリアントを包含し、これは、napDNAbpもしくは他のプログラム可能な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得る。

【０４７５】

いずれかのポリメラーゼが、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子に用いられ得る。ポリメラーゼは野生型ポリメラーゼ、機能的フラグメント、変異体、バリアント、または短縮されたバリアント、および同類であり得る。ポリメラーゼは、真核、原核、古細菌、もしくはウイルス生物からの野生型ポリメラーゼを包含し得、および/またはポリメラーゼは遺伝子工学、変異導入、指向性進化に基づくプロセスによって改変され得る。ポリメラーゼはT7 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、KlenowフラグメントDNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIII、および同類を包含し得る。ポリメラーゼは熱安定性でもまたあり得、Taq、Tne、Tma、Pfu、Tfl、Tth、Stoffelフラグメント、VENT(登録商標)およびDEEPVENT(登録商標)DNAポリメラーゼ、KOD、Tgo、JDF3、ならびにそれらの変異体、バリアント、および誘導体を包含し得る(米国特許第5,436,149号;米国特許第4,889,818号;米国特許第4,965,185号;米国特許第5,079,352号;米国特許第5,614,365号;米国特許第5,374,553号;米国特許第5,270,179号;米国特許第5,047,342号;米国特許第5,512,462号;WO 92/06188;WO 92/06200;WO 96/10640;Barnes,W.M.,Gene 112:29-35(1992);Lawyer,F.C.,et al.,PCR Meth. Appl.2:275-287(1993);Flaman,J.-M,et al.,Nuc.Acids Res.22(15):3259-3260(1994)(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)を参照)。より長い核酸分子(例えば、長さが約3-5Kbよりも長い核酸分子)の合成には、少なくとも2つのDNAポリメラーゼが使用され得る。ある態様において、ポリメラーゼの1つは3'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠き得、他は3'エキソヌクレアーゼ活性を有し得る。かかるペアリングは同じかまたは異なるポリメラーゼを包含し得る。3'エキソヌクレアーゼ活性を実質的に欠くDNAポリメラーゼの例は、Taq、Tne(exo-)、Tma(exo-)、Pfu(exo-)、Pwo(exo-)、exo-KOD、およびTth DNAポリメラーゼ、なら

びにそれらの変異体、バリアント、および誘導体を包含するが、これらに限定されない。
【０４７６】
好ましくは、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子に使用可能なポリメラーゼは「鋳型依存性」ポリメラーゼである(なぜなら、ポリメラーゼは、プライム編集の間に合成中のDNA鎖の配列を規定するためにはDNA合成鋳型に依拠することを意図されるからである。本願において用いられる用語「鋳型DNA分子」は、相補的な核酸鎖がDNAポリメラーゼによって例えばPEgRNAのDNA合成鋳型のプライマー伸長反応によって次いで合成される核酸の鎖を言う。
【０４７７】
本願において用いられる用語「鋳型依存的様式」は、プライマー分子の鋳型依存的伸長(例えば、DNAポリメラーゼによるDNA合成)が関わるプロセスを言うことを意図される。用語「鋳型依存的様式」は、ポリヌクレオチドの新たに合成される鎖の配列が相補的な塩基対形成の周知のルールによって記述されるRNAまたはDNAのポリヌクレオチド合成を言う(例えば、Watson,J.D.et al.,In:Molecular Biology of the Gene,4th Ed.,W.A.Benjamin,Inc.,Menlo Park,Calif.(1987)を見よ)。用語「相補的」は、塩基対形成による2つのポリヌクレオチド鎖の領域間のまたは2つのヌクレオチド間の配列相補性の幅広い概念を言う。アデニンヌクレオチドは、チミンまたはウラシルであるヌクレオチドと特異的な水素結合を形成する(「塩基対形成する」)ことができるということが公知である。類似に、シトシンヌクレオチドは、グアニンヌクレオチドと塩基対形成することができるということが公知である。そのため、プライム編集のケースでは、DNA合成鋳型に対してプライム編集因子のポリメラーゼによって合成されるDNAの一本鎖は、DNA合成鋳型の配列に対して「相補的」であると言われるということが言われ得る。
【０４７８】
A．例示のポリメラーゼ
種々の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子はポリメラーゼを含む。本開示は、いずれかの天然に存在する生物もしくはウイルスから得られるか、または市販のもしくは非市販のソースから得られるいずれかの野生型ポリメラーゼを企図する。加えて、本開示の多重フラッププライム編集因子に使用可能なポリメラーゼは、いずれかの天然に存在する変異体ポリメラーゼ、操作された変異体ポリメラーゼ、または他のバリアントポリメラーゼを包含し得、機能を保持する短縮されたバリアントを包含する。本願において使用可能なポリメラーゼは、特定のアミノ酸置換、例えば具体的に本明細書に開示のものを含有するようにもまた操作され得る。ある種の好ましい態様では、本開示の多重フラッププライム編集因子に使用可能なポリメラーゼは、鋳型に基づくポリメラーゼである。すなわち、それらは鋳型依存的な様式でヌクレオチド配列を合成する。
【０４７９】
ポリメラーゼは、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子システムに関して用いられ得る、ヌクレオチド鎖を合成する酵素である。ポリメラーゼは好ましくは「鋳型依存性」ポリメラーゼである(すなわち、鋳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)。ある種の構成では、ポリメラーゼは「鋳型非依存性」でもまたあり得る(すなわち、鋳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)。ポリメラーゼはさらに「DNAポリメラーゼ」または「RNAポリメラーゼ」としてもまた類別され得る。種々の態様において、多重フラッププライム編集因子システムはDNAポリメラーゼを含む。種々の態様において、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、これによると、鋳型分子はDNAの鎖である)。かかるケースでは、DNA鋳型分子はPEgRNAであり得、伸長アームはDNAの鎖を含む。かかるケースでは、PEgRNAはキメラまたはハイブリッドPEgRNAともまた言われ得、これがRNA部分(すなわち、スペーサーおよびgRNAコアを包含するガイドRNA構成要素)およびDNA部分(すなわち、伸長アーム)を含む。種々の他の態様において、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、これによると、鋳型分子はRNAの鎖である)。かかるケースでは、PEgRNAはRNAであり、すなわちRNA伸長

を包含する。用語「ポリメラーゼ」は、ヌクレオチドの重合を触媒する酵素をもまた言い得る(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リングしたプライマー(例えば、例えば、PEgRNAのプライマー結合部位にアニーリングしたプライマー配列)の3'端において合成を開始し、鋳型鎖の5'端の方へ進むであろう。「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願において用いられる用語DNAポリメラーゼは、「その機能的フラグメント」を包含する。「その機能的フラグメント」は、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、ポリメラーゼのアミノ酸配列全体未満を包摂する野生型または変異体DNAポリメラーゼのいずれかの部分を言う。かかる機能的フラグメントは別個の実体として存在し得るか、またはそれ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成分であり得る。

【０４８０】

いくつかの態様では、ポリメラーゼはバクテリオファージからであり得る。バクテリオファージDNAポリメラーゼは5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を一般的に欠いている。なぜなら、この活性は別個のポリペプチドによってコードされるからである。好適なDNAポリメラーゼの例はT4、T7、およびファイ29 DNAポリメラーゼである。市販で利用可能な酵素は:T4(多くのソース、例えばEpicentreから利用可能)およびT7(多くのソース、例えば未改変についてはEpicentreおよび3'→5'のエキソT7「Sequenase」DNAポリメラーゼについてはUSBから利用可能)である。

【０４８１】

他の態様、ポリメラーゼは古細菌ポリメラーゼである。古細菌において同定されているDNAポリメラーゼの2つの異なるクラスがある:1．ファミリーB/pol I型(Pyrococcus furiosusからのPfuのホモログ)および2．pol II型(P.furiosus DP1/DP2 2サブユニットポリメラーゼのホモログ)である。両クラスからのDNAポリメラーゼは、関連する5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を天然に欠くことと、3'→5'のエキソヌクレアーゼ(プルーフリーディング)活性を所有することとが示されている。好適なDNAポリメラーゼ(pol Iまたはpol II)は、所望のアッセイ温度に類似である最適な成長温度を有する古細菌に由来し得る。

【０４８２】

熱安定性古細菌DNAポリメラーゼはPyrococcus種(furiosus、sp. GB-D、woesii、abysii、horikoshii)、Thermococcus種(kodakaraensis KOD1、litoralis、sp.9 degrees North-7、sp. JDF-3、gorgonarius)、Pyrodictium occultum、およびArchaeoglobus fulgidusから単離される。

【０４８３】

ポリメラーゼはユーバクテリウム種からでもまたあり得る。ユーバクテリウムDNAポリメラーゼの3つのクラス、pol I、II、およびIIIがある。Pol I DNAポリメラーゼファミリーの酵素は5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を所有し、ある種のメンバーは3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性をもまた発揮する。Pol II DNAポリメラーゼは5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を天然に欠くが、3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性は発揮する。Pol III DNAポリメラーゼは細胞の主要な複製DNAポリメラーゼを表し、複数のサブユニットから成る。pol III触媒サブユニットは5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を欠くが、いくつかのケースでは、3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性が同じポリペプチド上に位置付けられる。

【０４８４】

種々の市販で利用可能なPol I DNAポリメラーゼがあり、これらのいくつかは5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を縮減または廃止するように改変されている。

【０４８５】

好適な熱安定性pol I DNAポリメラーゼは、Thermus種およびThermotoga maritima、例えばThermus aquaticus(Taq)、Thermus thermophilus(Tth)、およびThermotoga maritima(Tma UlTma)を包含する種々の好熱ユーバクテリウムから単離

され得る。

【０４８６】

上に列記されているものに関係する追加のユーバクテリウムはThermophilic Bacteria(Kristjansson, J. K., ed.) CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1992に記載されている。

【０４８７】

本発明は、さらに、米国特許第5,677,152号、第6,479,264号、および第6,183,998号に開示されている方法に従って化学的に改変されているキメラまたは非キメラDNAポリメラーゼを可能にする。これらの内容はそれらの全体が参照によってここに組み込まれる。

【０４８８】

上に列記されているものに関係する追加の古細菌DNAポリメラーゼは次の参照に記載されている:Archaea:A Laboratory Manual(Robb,F.T. and Place,A.R.,eds.),Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1995およびThermophilic Bacteria(Kristjansson,J.K.,ed.)CRC Press,Inc.,Boca Raton,Fla.,1992。

【０４８９】

B．例示の逆転写酵素

種々の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子はポリメラーゼとして逆転写酵素を含む。本開示は、いずれかの天然に存在する生物もしくはウイルスから得られるかまたは市販のもしくは非市販のソースから得られるいずれかの野生型逆転写酵素を企図する。加えて、本開示の多重フラッププライム編集因子に使用可能な逆転写酵素は、いずれかの天然に存在する変異体RT、操作された変異体RT、または他のバリアントRTを包含し得、機能を保持する短縮されたバリアントを包含する。RTは、特定のアミノ酸置換、例えば具体的に本明細書に開示のものを含有するようにもまた操作され得る。

【０４９０】

逆転写酵素は多機能酵素であり、典型的には、RNAおよびDNA依存性DNA重合活性、ならびにRNA-DNAハイブリッド中のRNAの切断を触媒するRNaseH活性を包含する3つの酵素活性を有する。逆転写酵素のいくつかの変異体は、mRNAの意図されない損傷を防止するためにRNaseH部分を不能化している。mRNAを鋳型として用いて相補的なDNA(cDNA)を合成するこれらの酵素は、RNAウイルスにおいて最初に同定された。続いて逆転写酵素は直接的にウイルス粒子、細胞、または組織から単離および精製された(例として、Kacian et al.,1971,Biochim. Biophys.Acta 46:365-83;Yang et al.,1972,Biochem.Biophys.Res.Comm.47:505-11;Gerard et al.,1975,J.Virol.15:785-97;Liu et al.,1977,Arch.Virol.55 187-200;Kato et al.,1984,J.Virol. Methods 9:325-39;Luke et al.,1990,Biochem.29:1764-69およびLe Grice et al.,1991,J.Virol.65:7004-07(これらの各々は参照により組み込まれる)を参照)。より最近では、改善された特性、例えば熱安定性、忠実性、および活性を求めて、変異体および融合タンパク質が生出されている。当該技術分野で公知であるかまたは当該技術分野で公知の方法を用いて作られ得る逆転写酵素の野生型、バリアント、および/または変異体形態のいずれかは、本願において企図される。

【０４９１】

逆転写酵素(RT)遺伝子(またはそれに含有される遺伝情報)はいくつもの異なるソースから得られ得る。例えば、遺伝子は、レトロウイルスに感染している真核細胞から、またはレトロウイルスゲノム全体もしくはそれの部分どちらかを含有するいくつものプラスミドから得られ得る。加えて、RT遺伝子を含有するメッセンジャーRNA様のRNAがレトロウイルスから得られ得る。RTのソースの例は、モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLVまたはMLVRT);ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1);ウシ白血病ウイルス(BLV);ラウス肉腫ウイルス(RSV);ヒト免疫不全ウイルス(HIV);Saccharomycesを包含する酵母、Neurospora、Drosophila;霊長類;および齧歯類を包含するが、これらに限定されな

い。例えば、Weiss,et al.,米国特許第4,663,290号(1987);Gerard,G.R.,DNA:271-79(1986);Kotewicz,M.L.,et al.,Gene 35:249-58(1985);Tanese,N.,et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA):4944-48(1985);Roth,M.J.,at al.,J.Biol.Chem.260:9326-35(1985);Michel,F.,et al.,Nature 316:641-43(1985);Akins,R.A.,et al.,Cell 47:505-16(1986),EMBO J.4:1267-75(1985);およびFawcett,D.F.,Cell 47:1007-15(1986)(こ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)を参照。

【０４９２】

野生型RT

本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子による使用のための例示の酵素は、M-MLV逆転写酵素およびRSV逆転写酵素を包含し得るが、これらに限定されない。逆転写酵素活性を有する酵素は市販で利用可能である。ある態様において、逆転写酵素は、多重フラッププライム編集因子(PE)システムの他の構成要素に対してトランスで提供される。つまり、逆転写酵素は、個々の構成要素として、すなわちnapDNAbpとの融合タンパク質としてではなく、発現または別様に提供される。

【０４９３】

当業者は、野生型逆転写酵素が(モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV);ヒト免疫不全ウイルス(HIV)逆転写酵素、およびトリ白血病・肉腫ウイルス(ASLV)逆転写酵素を包含するが、これらに限定されず、これはラウス肉腫ウイルス(RSV)逆転写酵素、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)逆転写酵素、トリ赤芽球症ウイルス(AEV)ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ骨髄球腫症ウイルスMC29ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ細網内皮症ウイルス(REV-T)ヘルパーウイルスREV-A逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスUR2ヘルパーウイルスUR2AV逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスY73ヘルパーウイルスYAV逆転写酵素、ラウス随伴ウイルス(RAV)逆転写酵素、および骨髄芽球症ウイルス随伴ウイルス(MAV)逆転写酵素を包含するが、これらに限定されない)、本明細書に記載の対象の方法および組成物に好適に用いられ得るということを認識するであろう。

【０４９４】

例示の野生型RT酵素は次のとおりである:

【表２５－１】

説明	配列番号
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 PE1(本明細書に開示の融合タンパク質プライム編集因子 1)に使用される	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAP LIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTP LLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQ WYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQG FKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQG TRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARK ETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTL FNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLT MGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGP VVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWY TDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQAL KMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEIL ALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPD TSTLLIENSSP(配列番号 700)
逆転写酵素 モロニーマウス白血病ウイルス 参照配列 AAA66622.1	AFPLERPDWDYTTQAGRNHLVHYRQLLLAGLQNAGRSPTNLAKVKGI TQGPNESPSAFLERLKEAYRRYTPYDPEDPGQETNVSMSFIWQSAPDI GRKLGRLEDLKSKTLGDLVREAEKIFNKRETPEEREERIRRETEEKEER RRTVDEQKEKERDRRRHREMSKLLATVVIGQEQDRQEGERKRPQLDK DQCAYCKEKGHWAKDCPKKPRGPRGPRPQTSLLTLGDXGGQGQDPPP EPRITLKVGGQPVTFLVDTGAQHSVLTQNPGPLSDKSAWVQGATGGK RYRWTTDRKVHLATGKVTHSFLHVPDCPYPLLGRDLLTKLKAQIHFE GSGAQVVGPMGQPLQVLTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGFTWLSDFPQ AWAESGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQR LLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPT VPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPE MGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFR(配列番号90)
逆転写酵素	TLQLEEEYRLFEPESTQKQEMDIWLKNFPQAWAETGGMGTAHCQAPV LIQLKATATPISIRQYPMPHEAYQGIKPHIRRMLDQGILKPCQSPWNTPL

【表２５－２】

説明	配列番号
ネコ白血病ウイルス 参照配列 NP955579.1	LPVKKPGTEDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSTLPPSHPWY TVLDLKDAFFCLRLHSESQLLFAFEWRDPEIGLSGQLTWTRLPQGFKN SPTLFDEALHSDLADFRVRYPALVLLQYVDDLLLAAATRTECLEGTKA LLETLGNKGYRASAKKAQICLQEVTYLGYSLKDGQRWLTKARKEAIL SIPVPKNSRQVREFLGTAGYCRLWIPGFAELAAPLYPLTRPGTLFQWGT EQQLAFEDIKKALLSSPALGLPDITKPFELFIDENSGFAKGVLVQKLGP WKRPVAYLSKKLDTVASGWPPCLRMVAAIAILVKDAGKLTLGQPLTIL TSHPVEALVRQPPNKWLSNARMTHYQAMLLDAERVHFGPTVSLNPAT LLPLPSGGNHHDCLQILAETHGTRPDLTDQPLPDADLTWYTDGSSFIR NGEREAGAAVTTESEVIWAAPLPPGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKL TVYTDSRYAFATTHVHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKNEILALLEALFLP KRLSIIHCPGHQKGDSPQAKGNRLADDTAKKAATETHSSLTVL（配列番号91）
逆転写酵素 HIV-1 RT、 A 鎖 参照配列 ITL3-A	PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKI GPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPA GLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYN VLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLYVGSDLEIG QHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQP IVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLXKLLRGTKALTE VIPLTEEAELELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGQWTY QIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTP KFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPPLVKLWYQLEKEPI VGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNRGRQKVVTLTDTTNQKTELQ AIYLALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPDQSESELVNQIIEQLIKKEK VYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAGIRKV（配列番号92） MARTINELLI ET AL., VIROLOGY, 1990, 174(1): 135-144 を参照（これは参照により組み込まれる）
逆転写酵素 HIV-1 RT、 B 鎖 参照配列 ITL3-B	PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKI GPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPA GLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYN VLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLYVGSDLEIG QHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQP IVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTE VIPLTEEAELELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGQWTY QIYQEPFKNLKTGKYARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTP KFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPPLVKLWYQLEKEPI VGAETF（配列番号93） STAMMERS ET AL., J. MOL. BIOL., 1994, 242(4): 586-588 を参照（これは参照により組み込まれる）
逆転写酵素 ラウス肉腫ウイルス RT 参照配列 ACL14945	TVALHLAIPLKWKPNHTPVWIDQWPLPEGKLVALTQLVEKELQLGHIE PSLSCWNTPVFVIRKASGSYRLLHDLRAVNAKLVPFGAVQQGAPVLSA LPRGWPLMVLDLKDCFFSIPLAEQDREAFAFTLPSVNNQAPARRFQW KVLPQGMTCSPTICQLIVGQILEPLRLKHPSLRMLHYMDDLLLAASSH DGLEAAGEEVISTLERAGFTISPDKVQKEPGVQYLGYKLGSTYAAPVG LVAEPRIATLWDVQKLVGSLQWLRPALGIPPRLRGPFYEQLRGSDPNEA REWNLDMKMAWREIVQLSTTAALERWDPALPLEGAVARCEQGAIGVL GQGLSTHPRPCLWLFSTQPTKAFTAWLEVLTLLITKLRASAVRTFGKEV DILLLPACFRDELPLPEGILLALRGFAGKIRSSDTPSIFDIARPLHVSLKV RVTDHPVPGPTVFTDASSSTHKGVVVWREGPRWEIKEIADLGASVQQ LEARAVAMALLLWPTTPTNVVTDSAFVAKMLLKMGQEGVPSTAAAFI

【表２５－３】

説明	配列番号
	LEDALSQRSAMAAVLHVRSHSEVPGFFTEGNDVADSQATFQAYPLRE AKDLHTALHIGPRALSKACNISMQQAREVVQTCPHCNSAPALEAGVN PRGLGPLQIWQTDFTLEPRMAPRSWLAVTVDTASSAIVVTQHGRVTSV AAQHHWATVIAVLGRPKAIKTDNGSCFTSKSTREWLARWGIAHTTGIP GNSQGQAMVERANRLLKDKIRVLAEGDGFMKRIPTSKQGELLAKAM YALNHFERGENTKTPIQKHWRPTVLTEGPPVKIRIETGEWEKGWNVLV WGRGYAAVKNRDTDKVIWVPSRKVKPDIAQKDEVTKKDEASPLFA （配列番号94） YASUKAWA ET AL., J. BIOCHEM. 2009, 145(3): 315-324 を参照（これは参照により組み込まれる）
逆転写酵素 カリフラワーモザイクウイルス RT 参照配列 AGT42196	MMDHLLQKTQIQNQTEQVMNITNPNSIYIKGRLYFKGYKKIELHCFVD TGASLCIASKFVIPEEHWINAERPIMVKIADGSSITINKVCRDIDLIIAGE IFHIPTVYQQESGIDFIIGNNFCQLYEPFIQFTDRVIFTKDRTYPVHIAKLT RAVRVGTEGFLESMKKRSKTQQPEPVNISTNKIAILSEGRRLSEEKLFIT QQRMQKIEELLEKVCSENPLDPNKTKQWMKASIKLSDPSKAIKVKPM KYSPMDREEFDKQIKELLDLKVIKPSKSPHMAPAFLVNNEAEKRRGKK RMVVNYKAMNKATVGDAYNLPNKDELLTLIRGKKIFSSFDCKSGFWQ VLLDQDSRPLTAFTCPQGHYEWNVVPFGLKQAPSIFQRHMDEAFRVF RKFCCVYVDDILVFSNNEEDHLLHVAMILQKCNQHGIILSKKKAQLFK KKINFLGLEIDEGTHKPQGHILEHINKFPDTLEDKKQLQRFLGILTYASD YIPKLAQIRKPLQAKLKENVPWKWTKEDTLYMQKVKKNLQGFPPLH HPLPEEKLIIETDASDDYWGGMLKAIKINEGTNTELICRYASGSFKAAE KNYHSNDKETLAVINTIKKFSIYLTPVHFLIRTDNTHFKSFVNLNYKGD SKLGRNIRWQAWLSHYSFDVEHIKGTDNHFADFLSREFNRVNS（配列番号95） FARZADFAR ET AL., VIRUS GENES, 2013, 47(2): 347-356 を参照（これは参照により組み込まれる）
逆転写酵素 Klebsiella pneuomiae 参照配列 RFF81513.1	MKEKISKIDKNFYTDIFIKTSFQNEFEAGGVIPPIAKNQVSTISNKNKTF YSLAHSSPHYSIQTRIEKFLLKNIPLSASSFAFRKERSYLHYLEPHTQNV KYCHLDIVSFFHSIDVNIVRDTFSVYFSDEFLVKEKQSLLDAFMASVTL TAELDGVEKTFIPMGFKSSPSISNIIFRKIDILIQKFCDKNKITYTRYADD LLFSTKKENNILSSTFFINEISSILSINKFKLNKSKYLYKEGTISLGGYVIE NILKDNSSGNIRLSSSKLNPLYKALYEIKKGSSSKHICIKVFNLKLKRFI YKKNKEKFEAKFYSSQLKNKLLGYRSYLLSFVIFHKKYKCINPIFLEKC VFLISEIESIMNRKF（配列番号96）
逆転写酵素 Escerichia coli RT 参照配列 TGH57013	MKITSNNVTAVINGKGWHSINWKKCHQHVKTIQTRIAKAACNQQWR TVGRLQRLLVRSFSARALAVKRVTENSGRKTPGVDGQIWSTPESKWE AIFKLRRKGYKPLPLKRVFIPKSNGKKRPLGIPVMLDRAMQALHLLGL EPVSETNADHNSYGFRPARCTADAIQQVCNMYSSRNASKWVLEGDIK GCFEHISHEWLLENIPMDKQILRNWLKAGIIEKSIFSKTLSGTPQGGIISP VLANMALDGLERLLQNRFGRNRLI（配列番号97）
逆転写酵素 *Bacillus subtilis* RT 参照配列 QBJ66766	MSKIKINYEKYHIKPFPHFDQRIKVNKKVKENLQNPFYIAAHSFYPFIH YKKISYKFKNGTLSSPKERDIFYSGHMDGYIYKHYGEILNHKYNNTCI GKGIDHVSLAYRNNKMGKSNIHFAAEVINFISEQQQAFIFVSDFSSYFD SLDHAILKEKLIEVLEEQDKLSKDWWNVFKHITRYNWVEKEEVISDLE CTKEKIARDKKSRERYYTPAEFREFRKRVNIKSNDTGVGIPQGTAISAV LANVYAIDLDQKLNQYALKYGGIYRRYSDDIIMVLPMTSDGQDPSND HVSFIKSVVKRNKVTMGDSKTSVLYYANNNIYEDYQRKRESKMDYL GFSFDGMTVKIREKSLFKYYHRTYKKINSINWASVKKEKKVGRKKLY

【表２５－４】

説明	配列番号
	LLYSHLGRNYKGHGNFISYCKKAHAVFEGNKKIESLINQQIKRHWKKIQKRLVDV（配列番号98）
*EUBACTERIUM RECTALE*グループIIイントロンRT	DTSNLMEQILSSDNLNRAYLQVVRNKGAEGVDGMKYTELKEHLAKNGETIKGQLRTRKYKPQPARRVEIPKPDGGVRNLGVPTVTDRFIQQAIAQVLTPIYEEQFHDHSYGFRPNRCAQQAILTALNIMNDGNDWIVDIDLEKFFDTVNHDKLMTLIGRTIKDGDVISIVRKYLVSGIMIDDEYEDSIVGTPQGGNLSPLLANIMLNELDKEMEKRGLNFVRYADDCIIMVGSEMSANRVMRNISRFIEEKLGLKVNMTKSKVDRPSGLKYLGFGFYFDPRAHQFKAKPHAKSVAKFKKRMKELTCRSWGVSNSYKVEKLNQLIRGWINYFKIGSMKTLCKELDSRIRYRLRMCIWKQWKTPQNQEKNLVKLGIDRNTARRVAYTGKRIAYVCNKGAVNVAISNKRLASFGLISMLDYYIEKCVTC（配列番号99）
*GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*グループIIイントロンRT	ALLERILARDNLITALKRVEANQGAPGIDGVSTDQLRDYIRAHWSTIHAQLLAGTYRPAPVRRVEIPKPGGGTRQLGIPTVVDRLIQQAILQELTPIFDPDFSSSSFGFRPGRNAHDAVRQAQGYIQEGYRYVVDMDLEKFFDRVNHDILMSRVARKVKDKRVLKLIRAYLQAGVMIEGVKVQTEEGTPQGGPLSPLLANILLDDLDKELEKRGLKFCRYADDCNIYVKSLRAGQRVKQSIQRFLEKTLKLKVNEEKSAVDRPWKRAFLGFSFTPERKARIRLAPRSIQRLKQRIRQLTNPNWSISMPERIHRVNQYVMGWIGYFRLVETPSVLQTIEGWIRRRLRLCQWLQWKRVRTRIRELRALGLKETAVMEIANTRKGAWRTTKTPQLHQALGKTYWTAQGLKSLTQR（配列番号100）

【０４９５】

バリアントおよびエラーを起こしやすいRT

逆転写酵素は、相補的なDNA(cDNA)鎖をRNA鋳型から合成することにとって必須である。逆転写酵素は、異なる生化学的活性を発揮する別物のドメインから成る酵素である。酵素は次のとおりRNA鋳型からのDNAの合成を触媒する:アニーリングしたプライマーの存在下において、逆転写酵素はRNA鋳型に結合し、重合反応を開始する。RNA依存性DNAポリメラーゼ活性が相補的なDNA(cDNA)鎖を合成し、dNTPを組み込む。RNase H活性がDNA:RNA複合体のRNA鋳型を分解する。それゆえに、逆転写酵素は、(a)RNA/DNAハイブリッドを認識および結合する結合活性、(b)RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、および(c)RNase H活性を含む。加えて、逆転写酵素は、一般的に、それらの熱安定性、処理能力(dNTP組み込みの速度)、および忠実性(またはエラー率)を包含する種々の属性を有すると見なされる。本願において企図される逆転写酵素バリアントは、これらの酵素活性(例えば、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、RNase H活性、またはDNA/RNAハイブリッド結合活性)または酵素特性(例えば、熱安定性、処理能力、または忠実性)のいずれか1以上にインパクトを及ぼすかまたは変化させる、逆転写酵素のいずれかの変異を包含し得る。かかるバリアントは、当該技術分野においてパブリックドメインにおいて利用可能、市販で利用可能であり得るか、または指向性進化プロセス(例えば、PACEまたはPANCE)を包含する変異導入の公知の方法を用いて作られ得る。

【０４９６】

種々の態様において、逆転写酵素はバリアント逆転写酵素であり得る。本願において用いられる「バリアント逆転写酵素」は、参照配列(例えば、参照野生型配列)に対して相対的に1以上の変異(単数の変異、逆位、欠失、挿入、および再構成を包含する)を含む、いずれかの天然に存在するかまたは遺伝子操作されたバリアントを包含する。RTは、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、リボヌクレアーゼH活性、およびDNA依存性DNAポリメラーゼ活性を包含するいくつかの活性を天然に有する。集合的に、これらの活性は酵素が一本鎖RNAを二本鎖cDNAへと変換することを可能化する。レトロウイルスおよびレトロトランスポゾンでは、このcDNAは次いでホストゲノム上に取り入れし得、これから新たなRNAのコピーがホスト細胞転写によって作られ得る。バリアントRTは、これらの活性の1以上にインパクトを及ぼす変異を含み得る(これはこれらの活性を縮減もしくは増

大させるか、またはこれはこれらの活性をすっかり消去するかどちらかである)。加えて、バリアントRTは、RTを多かれ少なかれ安定に、凝集をよりしにくくし、精製および/もしくは検出を容易化する1以上の変異、ならびに/または特性もしくは特徴の他の(other the)改変を含み得る。

【０４９７】

当業者は、他の逆転写酵素(モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV);ヒト免疫不全ウイルス(HIV)逆転写酵素、およびトリ白血病・肉腫ウイルス(ASLV)逆転写酵素を包含するが、これらに限定されず、これはラウス肉腫ウイルス(RSV)逆転写酵素、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)逆転写酵素、トリ赤芽球症ウイルス(AEV)ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ骨髄球腫症ウイルスMC29ヘルパーウイルスMCAV逆転写酵素、トリ細網内皮症ウイルス(REV-T)ヘルパーウイルスREV-A逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスUR2ヘルパーウイルスUR2AV逆転写酵素、トリ肉腫ウイルスY73ヘルパーウイルスYAV逆転写酵素、ラウス随伴ウイルス(RAV)逆転写酵素、および骨髄芽球症関連ウイルス(MAV)逆転写酵素を包含するが、これらに限定されない)に由来するバリアント逆転写酵素が、本明細書に記載の対象の方法および組成物に好適に用いられ得るということを認識するであろう。

【０４９８】

バリアントRTを調製する1つの方法は、遺伝子改変によって(例えば、野生型逆転写酵素のDNA配列を改変することによって)である。DNA配列のランダムなおよび標的化された変異を許すいくつもの方法が当該技術分野において公知である(例えば、Ausubel et. al.Short Protocols in Molecular Biology(1995)3.sup.rd Ed.John Wiley & Sons,Inc.を見よ)。加えて、従来のおよびPCRに基づく方法両方を包含する部位特異的変異導入のためのいくつもの市販で利用可能なキットがある。例は、QuikChange部位特異的変異導入キット(AGILENT(登録商標))、Q5(登録商標)部位特異的変異導入キット(NEW ENGLAND BIOLABS(登録商標))、およびGeneArt(商標)部位特異的変異導入システム(THERMOFISHER SCIENTIFIC(登録商標))を包含する。

【０４９９】

加えて、変異体逆転写酵素が、挿入変異または短縮(N末端の、内部の、またはC末端の挿入または短縮)によって当業者に公知の方法論に従って生成され得る。本願において用いられる用語「変異」は、別の残基によるある配列、例えば核酸もしくはアミノ酸配列上の残基の置換、またはある配列上の1以上の残基の欠失もしくは挿入を言う。変異は、典型的には、元の残基、次に配列上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の。本願において提供されるアミノ酸置換(変異)を作るための種々の方法が当該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。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されない。変異は、タンパク質活性を縮減または廃止する変異の正常の結果である「機能喪失」変異を包含し得る。ほとんどの機能喪失変異は劣性である。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、この存在が変異の効果を補償するからである。変異は、「機能獲得」変異をもまた包摂する。これは、正常な条件下ではさも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、いくつもの帰結を有し得る。例えば、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、機能獲得変異は通常は優性である。

【０５００】

当該技術分野で公知の部位特異的変異導入のより古い方法は、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上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以上のミスマッチ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'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ホスト細菌に形質転換され、プラークが所望の変異についてスクリーニングされる。

【０５０１】

より最近では、部位特異的変異導入がPCR方法論を使用している。これらは一本鎖鋳型を要求しないという利点を有する。加えて、サブクローニングを要求しない方法が開発されている。PCRに基づく部位特異的変異導入が行われるときには、いくつかのイシュー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変異の拡張を防止するために、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、セレクション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。そして第4に、いくつかの熱安定性ポリメラーゼの非鋳型依存的な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、端を磨くステップを手続きに組み込むことが必要である。

【０５０２】

ランダム変異導入の方法が当該技術分野に存在し、これらは1以上のランダムに所在する変異を持つ変異体のパネルをもたらすであろう。次いで、変異体のかかるパネルは、所望の特性、例えば野生型逆転写酵素に対して相対的に増大した安定性を発揮するものについてスクリーニングされ得る。

【０５０３】

ランダムな変異導入のための方法の例はいわゆる「エラーを起こしやすいPCR法」である。名称が含意するとおり、方法は、DNAポリメラーゼが高忠実性組み込みを支持しない条件下において所与の配列を増幅する。エラーを起こしやすい組み込みを促す条件は異なるDNAポリメラーゼについて変わるが、当業者は所与の酵素についてかかる条件を決定し得る。増幅の忠実性においての多くのDNAポリメラーゼの鍵の変数は、例えば緩衝液中の二価金属イオンの型および濃度である。よって、マンガンイオンの使用および/またはマグネシウムもしくはマンガンイオン濃度のバリエーションが、ポリメラーゼのエラー率に影響するように適用され得る。

【０５０４】

種々の側面では、多重フラッププライム編集因子のRTは「エラーを起こしやすい」逆転写酵素バリアントであり得る。当該技術分野において公知および/または利用可能であるエラーを起こしやすい逆転写酵素が用いられ得る。逆転写酵素は天然にはいずれかのプルーフリーディング機能を有さず;それゆえに、逆転写酵素のエラー率はプルーフリーディング活性を含むDNAポリメラーゼよりも一般的に高いということは了解されるであろう。いずれかの具体的な逆転写酵素のエラー率は酵素の「忠実性」の特性であり、これはそのRNA鋳型に対してDNAの鋳型によって導かれる重合の正確度を表す。高忠実性を有するRTは低いエラー率を有する。反対に、低い忠実性を有するRTは高いエラー率を有する。M-MLVに基づく逆転写酵素の忠実性は、合成される15,000～27,000ヌクレオチドに1エラーの範囲のエラー率を有することが報告される。Boutabout et al.,"DNA synthesis fidelity by the reverse transcriptase of the yeast retrotransposon Ty1,"Nucleic Acids Res,2001,29:2217-2222を見よ。これは参照によって組み込まれる。それゆえに、この適用の目的には、「エラーを起こしやすい」であると考慮されるかまたは「エラーを起こしやすい忠実性」を有すると考慮される逆転写酵素は、合成される15,000ヌクレオチドに1つのエラー未満であるエラー率を有するものである。

【０５０５】

エラーを起こしやすい逆転写酵素は、出発RT酵素(例えば、野生型M-MLV RT)の変異導入によってもまた生出され得る。変異導入の方法は限定されず、指向性進化プロセス、例えばファージによって補助される連続的進化(PACE)またはファージによって補助される非連続的進化(PANCE)を包含し得る。本願において用いられる用語「ファージによって補助される連続的進化(PACE)」は、ファージをウイルスベクターとして使用する連続的進化を言う。PACEテクノロジーの一般概念は、例えば、2010年3月11日にWO2010/028347として公開された2009年9月8日出願の国際PCT出願PCT/US2009/056194;2012年6月28日にWO2012/088381として公開された2011年12月22日出願の国際PCT出願PCT/US2011/066747;2015年5月5日登録のU.S.出願U.S.特許No.9,023,594、2015年9月11日にWO2015/134121として公開された2015年1月20日出願の国際PCT出願PCT/US2015/012022、および2016年10月20日にWO2016/168631として公開された2016年4月15日出願の国際PCT出願PCT/US2016/027795に記載されている。これらの夫々の内容全体は参照によって本願に組み込まれる。

【０５０６】

エラーを起こしやすい逆転写酵素は、「ファージによって補助される非連続的進化(PANCE)」によってもまた得られ得る。本願において用いられるこれは、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言う。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有する進化する「セレクションファージ」(SP)の連続フ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。連続フ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。

【０５０７】

他のエラーを起こしやすい逆転写酵素が文献に記載されている。これらの夫々は本願の方法および組成物への使用を企図される。例えば、エラーを起こしやすい逆転写酵素は、Bebenek et al.,"Error-prone Polymerization by HIV-1 Reverse Transcriptase,"J Biol Chem,1993,Vol.268:10324-10334およびSebastian-Martin et al.,"Transcriptional inaccuracy threshold attenuates differences in RNA-dependent DNA synthesis fidelity between retroviral reverse transcriptases,"Scientific Reports,2018,Vol.8:627に記載されている。これらの夫々は参照によって組み込まれる。なお、さらに、エラーを起こしやすい逆転写酵素を包含する逆転写酵素は市販のサプライヤーから得られ得、全てNEW ENGLAND BIOLABS(登録商標)からのProtoScript(登録商標)(II)逆転写酵素、AMV逆転写酵素、WarmStart(登録商標)逆転写酵素、およびM-MuLV逆転写酵素、または全てTAKARA BIO USA,INC.(以前はCLONTECH)からのAMV逆転写酵素XL、SMARTScribe逆転写酵素、GPRウルトラピュアMMLV逆転写酵素を包含する。

【０５０８】

本願の開示はRNaseHドメインに変異を有する逆転写酵素をもまた企図する。上で言及されているとおり、逆転写酵素の本来的な特性の1つはRNase H活性であり、これはRNA:cDNAハイブリッドのRNA鋳型を重合と同時的に切断する。RNA鋳型が全長の逆転写の完了前に分解され得るので、RNase H活性は長いcDNAの合成にとっては望ましくなくあり得る。おそらくは酵素のポリメラーゼ活性とのその競合を原因として、RNase H活性は逆転写効率をもまた低下させ得る。それゆえに、本開示は改変されたRNaseH活性を含むいずれかの逆転写酵素バリアントを企図する。

【０５０９】

本願の開示は、RNA依存性DNAポリメラーゼドメインに変異を有する逆転写酵素をもまた企図する。上で言及されているとおり、逆転写酵素の本来的な特性の1つはRNA依存性DNAポリメラーゼ活性である。これは、RNA:cDNAハイブリッドの鋳型RNA鎖によっ

てコードされる新生cDNA鎖に核酸塩基を組み込む。RNA依存性DNAポリメラーゼ活性は、酵素の処理能力を増大させるかまたは減少させるかどちらかのために(すなわち、その組み込み速度の観点から)増大または減少させられ得る。それゆえに、本開示は、酵素の処理能力が未改変のバージョンに対して相対的に増大させられるかまたは減少させられるかどちらかのようにして、改変されたRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含むいずれかの逆転写酵素バリアントを企図する。

【０５１０】

変改された熱安定性特徴を有する逆転写酵素バリアントもまた本願において企図される。逆転写酵素が高い温度に耐える能力はcDNA合成の重要な側面である。上昇した反応温度は、強い二次構造および/または高いGC含量を有するRNAを変性することを助け、逆転写酵素が配列を読み通すことを許す。結果として、より高い温度における逆転写は全長cDNA合成およびより高い収量を可能化し、これは多重フラッププライム編集プロセスの結果としての3'フラップssDNAの改善された生成に至り得る。野生型M-MLV逆転写酵素は典型的には37～48℃の範囲に至適温度を有する;しかしながら、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃、58℃、59℃、60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、およびより高くを包含する48℃超のより高い温度において逆転写活性を許す変異が導入され得る。

【０５１１】

エラーを起こしやすいRT、熱安定性RT、処理能力増大RTを包含する本願において企図されるバリアント逆転写酵素は、変異導入または進化プロセスを包含する種々のルーチン戦略によって操作され得る。いくつかのケースでは、バリアントは単一の変異を導入することによって生じ得る。他のケースでは、バリアントは1より多くの変異を要求し得る。1より多くの変異を含む変異体では、所与の変異の効果は、具体的な変異体によって持たれる他の変異からは単離して、部位特異的変異導入による野生型遺伝子への同定された変異の導入によって評価され得る。次いで、それゆえに生じた一重変異体のスクリーニングアッセイは、その変異単独の効果の決定を許すであろう。

【０５１２】

本願において用いられるバリアントRT酵素は、本願において開示もしくは企図されるかまたは当該技術分野で公知のいずれかの野生型RTまたは変異体RTまたはフラグメントRTまたはRTの他のバリアントを包含するいずれかの参照RT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「RTバリアント」をもまた包含し得る。

【０５１３】

いくつかの態様では、RTバリアントは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、21、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、または最高で100、または最高で200、または最高で300、または最高で400、または最高で500、またはより多くのアミノ酸変化を、参照RTと比較して有し得る。いくつかの態様では、フラグメントが参照RTの対応するフラグメントと少なくとも約70％同一、少なくとも約80％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、少なくとも約99％同一、少なくとも約99.5％同一、または少なくとも約99.9％同一であるようにして、RTバリアントは参照RTのフラグメントを含む。いくつかの態様では、フラグメントは、対応する野生型RT(M-MLV逆転写酵素)(例えば、配列番号89)または配列番号90-100の逆転写酵素のいずれか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。

【０５１４】

いくつかの態様では、本開示は、それらの機能性を保持し、かついずれかの本明細書に開示のRTタンパク質のフラグメントであるRTフラグメントをもまた利用し得る。いくつかの態様では、RTフラグメントは長さが少なくとも100アミノ酸である。いくつかの態様では、フラグメントは長さが少なくとも100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、もしくは最高で600、またはより多くのアミノ酸である。

【０５１５】

なお他の態様において、本開示は、N末端もしくはC末端または両方がある種のアミノ酸数だけ短縮されているRTバリアントをもまた利用し得、これは、なお十分なポリメラーゼ機能を保持する短縮バリアントをもたらす。いくつかの態様では、RT短縮バリアントは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、または250アミノ酸の短縮を、タンパク質のN末端の端に有する。他の態様において、RT短縮バリアントは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、または250アミノ酸の短縮を、タンパク質のC末端の端に有する。なお他の態様において、RT短縮バリアントは同じかまたは異なる長さである短縮をN末端およびC末端の端に有する。

【０５１６】

例えば、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子は、M-MLV逆転写酵素の短縮されたバージョンを包含し得る。この態様では、逆転写酵素は4つの変異を含有する(D200N、T306K、W313F、T330P;PE2に存在するL603W変異は短縮を原因としてもはや存在しないということに注意)。この短縮された編集因子をコードするDNA配列は、PE2よりも522bp小さく、よって、DNA配列の送達がそのサイズを原因として難しい適用(すなわち、アデノ随伴ウイルスおよびレンチウイルス送達)にとってそれを可能性として有用にする。この態様はMMLV-RT(trunc)と言われ、次のアミノ酸配列を有する:

【表２６】

MMLV-RT(TRUNC)	*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPL KATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKP GTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAF FCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRD LADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKK AQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAG FCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGL PDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPC LRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHY QALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDNSRLIN*(配列番号766)

【０５１７】

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子は、本明細書に記載のRTバリアントの1つ、またはいずれかの参照Cas9バリアントと少なくとも約70

％同一、少なくとも約80％同一、少なくとも約90％同一、少なくとも約95％同一、少なくとも約96％同一、少なくとも約97％同一、少なくとも約98％同一、少なくとも約99％同一、少なくとも約99.5％同一、または少なくとも約99.9％同一であるそのRTバリアントを含み得る。

【０５１８】

なお他の態様において、本方法および組成物は、Effefson et al.,"Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase,"Science,June 24,2016,Vol.352:1590-1593に記載されているとおり、逆転写酵素へと進化させられたDNAポリメラーゼを利用し得る。これの内容は参照によって本願に組み込まれる。

【０５１９】

ある種の他の態様において、逆転写酵素は、napDNAbpをもまた含む融合タンパク質の構成要素として提供される。換言すると、いくつかの態様では、逆転写酵素は融合タンパク質としてnapDNAbpに融合される。

【０５２０】

種々の態様において、バリアント逆転写酵素は配列番号89によって表される野生型M-MLV逆転写酵素から操作され得る。

【０５２１】

種々の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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、次の変異の1以上を含むバリアントRTを包含し得る:配列番号89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。

【０５２２】

本開示の種々の態様に従って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の逆転写酵素が、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％配列同一性を次の野生型酵素または部分的な酵素に対して有するバリアントを包含する:

【表２７－１】

説明	配列(野生型に対するバリアント置換)
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 PE1(本明細書 に開示の融合	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT

50

【表２７－２】

説明	配列（野生型に対するバリアント置換）
タンパク質プライム編集因子1)に使用される	TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号89）
M-MLV RT D200N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号701）
M-MLV RT D200N T330P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号702）
M-MLV RT D200N T330P L603W	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号740）
M-MLV RT D200N T330P L603W E69K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQ**K**ARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT

【表２７－３】

説明	配列（野生型に対するバリアント置換）
	TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号703）
M-MLV RT D200N T330P L603W E302R	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLR**R**FLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号704）
M-MLV RT D200N T330P L603W E607K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTS**K**GKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号705）
M-MLV RT D200N T330P L603W L139P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSG**P**PPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号706）
M-MLV RT D200N T330P L603W L435G	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI **G**APHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT

【表２７－４】

説明	配列（野生型に対するバリアント置換）
	TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号707）
M-MLV RT D200N T330P L603W N454K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLS**K**ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号708）
M-MLV RT D200N T330P L603W T306K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号709）
M-MLV RT D200N T330P L603W W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号710）
M-MLV RT D200N T330P L603W D524G E562Q D583N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVT

【表２７－５】

説明	配列（野生型に対するバリアント置換）
	TETEVIWAKALPAGTSAQRA**Q**LIALTQALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号711）
M-MLV RT D200N T330P L603W E302R W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLR**R**FLGTAGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号712）
M-MLV RT D200N T330P L603W E607K L139P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSG**P**PPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTS**K**GKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号713）
M-MLV RT P51L S67K T197A H204R E302K F309N W313F T330P L435G N454K D524G D583N H594Q D653N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLII**L**LKAT STPVSIKQYPM**K**QEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSP**A**LFDEAL**R**RDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLR**K**FLGTAG**N**CRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI **G**APHAVEALVKQPPDRWLS**K**ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHI**Q**G EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MA**N**QAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号714）
M-MLV RT D200N P51L S67K T197A H204R E302K F309N W313F T330P L345G N454K D524G D583N H594Q D653N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLII**L**LKAT STPVSIKQYPM**K**QEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSP**A**LF**N**EAL**R**RDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLR**K**FLGTAG**N**CRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI **G**APHAVEALVKQPPDRWLS**K**ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVT

【表２７－６】

説明	配列(野生型に対するバリアント置換)
	TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHI**Q**G EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MA**N**QAARKAAITETPDTSTLLIENSSP(配列番号715)
M-MLV RT D200N T330P L603W T306K W313F PE2 において	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP(配列番号716)

【０５２３】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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、次の変異の1以上を含むバリアントRTを包含し得る:配列番号89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。

【０５２４】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはLである。

【０５２５】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【０５２６】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【０５２７】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはPである。

【０５２８】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはAである。

【0529】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはNである。

【0530】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはRである。

【0531】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはNである。

【0532】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【0533】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはRである。

【0534】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【0535】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはNである。

【0536】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはFである。

【０５３７】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはPである。

【０５３８】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはGである。

【０５３９】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはGである。

【０５４０】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【０５４１】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはGである。

【０５４２】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはQである。

【０５４３】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはNである。

【０５４４】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得

る。ある態様において、XはQである。

【０５４５】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはWである。

【０５４６】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはKである。

【０５４７】

種々の他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子(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89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変異を含むバリアントRTを包含し得、「X」はいずれかのアミノ酸であり得る。ある態様において、XはNである。

【０５４８】

本開示の種々の態様に従って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の逆転写酵素が、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％配列同一性を次の野生型酵素または部分的な酵素に対して有するバリアントを包含する:

【表２８－１】

説明	配列(野生型と比べたバリアント置換)
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 PE1(本明細書に開示のプライム編集因子１融合タンパク質)において使用される	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALF LPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP(配列番号89)
M-MLV RT D200N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALF LPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP(配列番号106)

【表２８－２】

説明	配列（野生型と比べたバリアント置換）
M-MLV RT D200N T330P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALF LPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号107）
M-MLV RT D200N T330P L603W	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号108）
M-MLV RT E69K D200N T330P L603W	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQ**K**ARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号109）
M-MLV RT D200N T330P L603W E302R	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLR**R**FLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK KLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS NARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIAL TQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKA LFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号110）
M-MLV RT D200N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL

【表２８－３】

説明	配列（野生型と比べたバリアント置換）
T330P L603W E607K	REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTS**K**GKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号111）
M-MLV RT D200N T330P L603W L139P	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSG**P**PPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号112）
M-MLV RT D200N T330P L603W L435G	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI**G**APHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号113）
M-MLV RT D200N T330P L603W N454K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS**K** ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号114）
M-MLV RT D200N T330P L603W	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA

【表２８－４】

説明	配列（野生型と比べたバリアント置換）
T306K	ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK KLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLS NARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIAL TQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKA LFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号115）
M-MLV RT D200N T330P L603W W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号116）
M-MLV RT D200N T330P L603W D524G E562Q D583N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRA**Q**LIALT QALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号117）
M-MLV RT D200N T330P L603W E302R W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLR**R**FLGTAGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号118）
M-MLV RT D200N T330P L603W E607K	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSG**P**PPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ

【表２８－５】

説明	配列（野生型と比べたバリアント置換）
L139P	KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTS**K**GKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号119）
M-MLV RT P51L S67K T197A H204R E302K F309N W313F T330P L435G N454K D524G D583N H594Q D653N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLII**L**LKATSTP VSIKQYPM**K**QEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSP**A**LFDEAL**R**RDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLR**K**FLGTAG**N**CRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK KLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI**G**APHAVEALVKQPPDRWLS **K**ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIAL TQALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHI**Q**GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKA LFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMA**N**QAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号120）
M-MLV RT P51L S67K T197A D200N H204R E302K F309N W313F T330P L345G N454K D524G D583N H594Q D653N	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLII**L**LKATSTP VSIKQYPM**K**QEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSP**A**LF**N**EAL**R**RDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLR**K**FLGTAG**N**CRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQ QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK KLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI**G**APHAVEALVKQPPDRWLS **K**ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLT DQPLPDADHTWYT**G**GSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIAL TQALKMAEGKKLNVYT**N**SRYAFATAHI**Q**GEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKA LFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMA**N**QAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号121）
M-MLV RT D200N T330P L603W T306K W313F PE2 において	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDL REVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEW RDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLA ATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR KETVMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQ KAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKK LDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSN ARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALT QALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKAL FLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号122）

【０５４９】

ここに記載される多重フラッププライム編集因子システムは、次の米国特許（これらの夫々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、変異を組み入れ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アントとを企図する。次の参照は当該技術分野の逆転写酵素を記載する。それらの開示の夫々はそれらの全体が参照によって本願に組み込まれる。

【０５５０】

Herzig,E.,Voronin,N.,Kucherenko,N.&Hizi,A.A Novel Leu92 Mutant of HIV-1 Reverse Transcriptase with a Selective Deficiency in Strand Transfe

r Causes a Loss of Viral Replication.J.Virol.89,8119-8129(2015).
【0551】
Mohr,G.et al.A Reverse Transcriptase-Cas1 Fusion Protein Contains a Cas6 Domain Required for Both CRISPR RNA Biogenesis and RNA Spacer Acquisition.Mol.Cell 72,700-714.e8(2018).
【0552】
Zhao,C.,Liu,F.&Pyle,A.M.An ultraprocessive, accurate reverse transcriptase encoded by a metazoan group II intron.RNA 24,183-195(2018).
【0553】
Zimmerly,S.&Wu,L.An Unexplored Diversity of Reverse Transcriptases in Bacteria.Microbiol Spectr 3,MDNA3-0058-2014(2015).
【0554】
Ostertag,E.M.&Kazazian Jr,H.H.Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. Annual Review of Genetics 35,501-538(2001).
【0555】
Perach,M.&Hizi,A.Catalytic Features of the Recombinant Reverse Transcriptase of Bovine Leukemia Virus Expressed in Bacteria.Virology 259,176-189(1999).
【0556】
Lim,D.et al.Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain.J.Virol.80,8379-8389(2006).
【0557】
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).
【0558】
Griffiths,D.J.Endogenous retroviruses in the human genome sequence.Genome Biol.2,REVIEWS1017(2001).
【0559】
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).
【0560】
Zimmerly,S.,Guo,H.,Perlman,P.S.&Lambowltz,A.M.Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription.Cell 82,545-554(1995).
【0561】
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).
【0562】
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).
【0563】
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).
【0564】
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).
【0565】
Blain,S.W.&Goff,S.P.Nuclease activities of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase.Mutants with altered substrate specificities.J. Biol.Chem.268,23585-23592(1993).
【0566】
Xiong,Y.&Eickbush,T.H.Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences.EMBO J 9,3353-3362(1990).
【0567】
Herschhorn,A.&Hizi,A.Retroviral reverse transcriptases.Cell.Mol.Life Sci.67,2717-2747(2010).
【0568】
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).
【0569】
Liu,M.et al.Reverse Transcriptase-Mediated Tropism Switching in Bordetella Bacteriophage.Science 295,2091-2094(2002).
【0570】
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).
【0571】
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).
【0572】
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).
【0573】
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).
【0574】
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).
【0575】
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).
【0576】
Das,D.&Georgiadis,M.M.The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus.Structure 12,819-829(2004).
【0577】
Avidan,O.,Meer,M.E.,Oz,I&Hizi,A.The processivity and fidelity of DNA sy

nthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus .European Journal of Biochemistry 269,859-86(2002).

【０５７８】

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).

【０５７９】

Monot,C.et al.The Specificity and Flexibility of L1 Reverse Transcription Priming at Imperfect T-Tracts.PLOS Genetics 9,e1003499(2013).

【０５８０】

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).

【０５８１】

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。

【０５８２】

[4]プライム編集因子

本開示はプライム編集因子を含むシステムを提供する。一側面において、本開示は、第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体を含む編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステムを提供し、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれは、(1)(i)核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および(ii)RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを含むプライム編集因子と;(2)スペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含むpegRNAとを含み、第1のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型は第1の一本鎖DNA配列をコードし、第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型は第2の一本鎖DNA配列をコードし、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列はそれぞれが互いに対する相補性の領域を含み、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列は、編集されるべき標的部位のDNA配列と比較して編集された部分を含む二重鎖を形成し、これは編集されるべき標的部位に取り入れられる。

【０５８３】

別の側面において、本開示は1以上の二本鎖DNA配列を編集するためのシステムを提供し、システムは:

a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、

を含む第3のプライム編集因子複合体;

d)i．第4の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、
を含む第4のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のPEgRNAは、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAは第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、第3のPEgRNAは第3の一本鎖DNA配列をコードする第3のDNA合成鋳型を含み、第4のPEgRNAは第4の一本鎖DNA配列をコードする第4のDNA合成鋳型を含み;
第1および第3の一本鎖DNA配列はそれぞれが互いに対する相補性の領域を含み;第2および第4の一本鎖DNA配列はそれぞれが互いに対する相補性の領域を含む。

【０５８４】

いくつかの態様において、本願に記載されるシステムに用いられるプライム編集因子(例えば、上に記載されるシステムの第1のプライム編集因子、第2のプライム編集因子、第3のプライム編集因子、および/または第4のプライム編集因子)は融合タンパク質として提供される。いくつかの態様において、プライム編集因子融合タンパク質はnapDNAbpおよびポリメラーゼ(例えば、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)を含む。いくつかの態様において、napDNAbpおよびポリメラーゼは、任意にリンカーによって連結されて融合タンパク質を形成する。プライム編集因子融合タンパク質と融合タンパク質の追加のドメインとの種々の構成が本願においてさらに記載される。種々の態様において、本開示によって提供されるシステムおよび方法は、本願に記載されるプライム編集因子融合タンパク質のいずれかの使用を企図する。

【０５８５】

いくつかの態様において、本願に記載されるシステムに用いられるプライム編集因子複合体はプライム編集因子(例えば、上に記載されるシステムの第1のプライム編集因子、第2のプライム編集因子、第3のプライム編集因子、および/または第4のプライム編集因子)を含み、ここで、本明細書において加えて詳細に記載される通り、プライム編集因子の1以上の構成要素がトランスで提供される。いくつかの態様において、プライム編集因子はトランスで発現されるnapDNAbpおよびポリメラーゼを含む。いくつかの態様において、napDNAbpおよびポリメラーゼは1以上のベクターから発現される(例えば、両方の構成要素が同じベクターから発現されるか、または各構成要素が異なるベクターから発現される)。ある態様において、プライム編集因子はトランスで発現される本願に記載される追加の構成要素を含む。いくつかの態様において、本願に記載されるシステムに用いられるプライム編集因子は、融合タンパク質として提供される1以上のプライム編集因子、およびそれらの構成要素がトランスで提供される1以上のプライム編集因子を両方とも含み得る。

【０５８６】

いくつかの態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子システムは、任意にリンカーによって連結されるnapDNAbpおよびポリメラーゼ(例えば、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)を含む融合タンパク質を企図する。本願は、いずれかの好適なnapDNAbpおよびポリメラーゼ(例えば、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)が単一の融合タンパク質として組み合わせられることを企図する。napDNAbpおよびポリメラーゼ(例えば、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)の例は、夫々が本願において定められる。ポリメラーゼは当該技術分野において周知であり、アミノ酸配列は難なく利用可能であるので、本開示は本願において同定される特定のポリメラーゼに限定されることを決して意味されない。

【０５８７】

種々の態様において、融合タンパク質はいずれかの好適な構造的な構成を含み得る。例えば、融合タンパク質は、N末端→C末端方向に、napDNAbpをポリメラーゼ(例えば、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)

に融合されて含み得る。他の態様において、融合タンパク質は、N末端→C末端方向に、ポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)をnapDNAbpに融合されて含み得る。融合したドメインは、任意に、リンカー、例えばアミノ酸配列によって連結され得る。他の態様において、融合タンパク質は構造NH_2-[napDNAbp]-[ポリメラーゼ]-COOH;またはNH_2-[ポリメラーゼ]-[napDNAbp]-COOHを含み得、「]-[」の夫々のものは任意のリンカー配列の存在を指示する。ポリメラーゼが逆転写酵素である態様では、融合タンパク質は構造NH_2-[napDNAbp]-[RT]-COOH;またはNH_2-[RT]-[napDNAbp]-COOHを含み得、「]-[」の夫々のものは任意のリンカー配列の存在を指示する。

【０５８８】

例示の融合タンパク質が図14に図示されている。これはリンカー配列を介してニッカーゼCas9(「Cas9(H840A)」)に融合されたMLV逆転写酵素(「MLV-RT」)を含む融合タンパク質を示す。この例は、本明細書に記載のプライム編集因子(PE)システムに利用され得る融合タンパク質の範囲を限定することを意図されない。

【０５８９】

種々の態様において、多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は次のアミノ酸配列(本願においては「PE1」と言われる)を有し得、これは、H840A変異を含むCas9バリアント(すなわち、Cas9ニッカーゼ)およびM-MLV RT野生型と、N末端NLS配列(19アミノ酸)およびCas9ニッカーゼドメインのC末端をRTドメインのN末端に連結するアミノ酸リンカー(32アミノ酸)とを包含する。PE1融合タンパク質は次の構造を有する:[NLS]-[Cas9(H840A)]-[リンカー]-[MMLV_RT(wt)]。PE1およびその個々の構成要素のアミノ酸配列は次のとおりである:

【表２９－１】

説明	説明
PE1融合タンパク質 CAS9(H840A)−MMLV_RT(WT)	MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV** **LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF** **SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL** **RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQ** **TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI** **ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA** **KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE** **KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED** **LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY** **YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN** **LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL** **FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK** **DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRY** **TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDI** **QKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI** **VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK** **LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDK** **NRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD** **KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS** **DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKV** **YDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGE** **TGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI** **ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMER** **SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG** **NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE** **FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD** **TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD**<u>**SGGSSGGSSGSET**</u> <u>**PGTSESATPESSGGSSGGSS**</u>*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETG* *GMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT* *PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD* *AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADF* *RIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVK* *YLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPL* *YPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL* *TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPH* *AVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC*

【表２９－２】

説明	説明
	*LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKAL PAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEI KNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号123） 凡例： 核局在化の配列（NLS）最前列：（配列番号124）、最後尾：（配列番号133） CAS9（H840A）（配列番号126） 33アミノ酸リンカー（配列番号127） *M－MLV逆転写酵素*（配列番号128）
PE1－N末端NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV（配列番号124）
PE1－CAS9（H840A）（METマイナス）	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG ETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDK KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG HFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQ DLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIE KILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVD LLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKD FLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQV NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKY SLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENII HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLG GD（配列番号130）
PE1－CAS9ドメインとRTドメインとの間のリンカー（33アミノ酸）	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS（配列番号127）
PE1－M-MLV RT	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYP LTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI

【表２９－３】

説明	説明
	LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号132）
PE1－C末端NLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号133）

【０５９０】

別の態様では、多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は次のアミノ酸配列(本願においては「PE2」と言われる)を有し得、これは、H840A変異を含むCas9バリアント(すなわち、Cas9ニッカーゼ)ならびに変異D200N、T330P、L603W、T306K、およびW313Fを含むM-MLV RTと、N末端NLS配列(19アミノ酸)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末端に連結するアミノ酸リンカー(33アミノ酸)とを包含する。PE2融合タンパク質は次の構造を有する:[NLS]-[Cas9(H840A)]-[リンカー]-[MMLV_RT(D200N)(T330P)(L603W)(T306K)(W313F)]。PE2のアミノ酸配列は次のとおりである:

【表３０－１】

PE2融合タンパク質 CAS9(H840A)-MMLV_RT D200N T330P L603W T306K W313F	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRY TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDK NRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKV YDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGE TGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMER

【表３０－２】

	SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD<u>**SGGSSGGSSGSET PGTSESATPESSGGSSGGSS**</u>*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETG GMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADF RIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVK YLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPL YPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPH AVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKAL PAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEI KNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP**<u>**SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV**</u>(配列番号134) 凡例: <u>核局在化の配列(NLS)</u>最前列:(配列番号124)、最後尾:(配列番号133) CAS9(H840A)(配列番号137) <u>33アミノ酸リンカー</u>(配列番号127) *M－MLV逆転写酵素*(配列番号139)
PE2－N末端NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV(配列番号124)
PE2－CAS9(H840A)(METマイナス)	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSG ETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDK KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRG HFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRR LENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQ DLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDG TEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIE KILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVD LLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKD FLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ TTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDM YVDQELDINRLSDYDVD**<u>**A**</u>IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVV KKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHH AHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYF FYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQV NIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKY SLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENII HLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLG GD(配列番号141)

【表３０－３】

PE2－CAS9ドメインとRTドメインとの間のリンカー（3アミノ酸）	SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS（配列番号127）
PE2－MMLV_RT D200N T330P L603W T306K W313F	TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKAT STPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYR PVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTS QPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLIL LQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYL LKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYP LTK**P**GTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGV LTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVI LAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPE EGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVT TETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHG EIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNR MADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号143）
PE2－C末端NLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号133）

【０５９１】

更なる他の態様において、プライム編集因子融合タンパク質は、以下のアミノ酸配列を有していてもよい：

【表３１－１】

PE融合タンパク質 MMLV_RT(WT)-32AA-CAS9(H840A)	MKRTADGSEFESPKKKRKV*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETG GMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADF RIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVK YLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPL YPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPH AVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKAL PAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEI KNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSP***SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS*DKKYSIGLDIGTNS VGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRT ARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF

【表３１－２】

	GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIE GDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLE NLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL DNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEH HQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYP FLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVD KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGM RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDR FNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTY AHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTV KVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKEL GSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIV PQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLIT QRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYD ENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQ KQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRI DLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号145）

凡例：
核局在化の配列（NLS）最前列：（配列番号124）、最後尾：（配列番号133）
CAS9（H840A）（配列番号147）
33アミノ酸リンカー（配列番号127）
M－MLV逆転写酵素（配列番号149） |
| PE融合タンパク質

MMLV_RT(WT)
-60AA-
CAS9(H840A) | **MKRTADGSEFESPKKKRKV***TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETG GMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNT PLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKD AFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADF RIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVK YLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPL YPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVL TQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPH AVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNC LDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKAL PAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEI KNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTST LLIENSSPS**<u>**GGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPYDVPDYAGSAAPAAKKK KLDGSGSGGSSGGS**</u>**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMA KVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQL FEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGL TPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFF DQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQR TFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLA** |

【表３１－３】

	RGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKV LPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRK VTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGR LSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMA RENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYY LQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGK SDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRK DFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR KMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARK KDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNE LALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFS KRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEP KKKRKV（配列番号150） 凡例： 核局在化の配列（NLS）最前列：（配列番号124）、最後尾：（配列番号133） CAS9（H840A）（配列番号153） アミノ酸リンカー（配列番号175） *M－MLV逆転写酵素*（配列番号149）
PE融合タンパク質 CAS9(H840A)-FEN1-MMLV_RT D200N T330P L603W T306K W313F	MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIF SNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQ TYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAA KNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNRED LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKN LPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRY TGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDI QKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEK LYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDK NRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELD KAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKV YDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGE TGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMER SSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKG NELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD**SGGSSGGSSGSET PGTSESATPESSGGSSGGSS**GIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASM

10 20 30 40 50

【表３１－４】

	SIYQFLIAVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVFDGKPPQ LKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKFTKRLVKVTKQHNDECKH LLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVKAGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTAS EAKKLPIQEFHLSRILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKH KSIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKWSEPNEEELIK FMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLDDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGS TKKKAKTGAAGKFKRGK**SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS***TLNI* *EDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIK* *QYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVN* *KRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPE* *MGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSEL* *DCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMG* *QPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEI* *KQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAA* *GWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHY* *QALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDA* *DHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAE* *GKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIH* *CPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP*SGGSKRTADGSEFE PKKKRKV（配列番号154） 凡例： 核局在化の配列（NLS）最前列：（配列番号124）、最後尾：（配列番号133） CAS9（H840A）（配列番号157） 33アミノ酸リンカー1（配列番号127） *M－MLV逆転写酵素*（配列番号159） 33アミノ酸リンカー2（配列番号127） FEN1（配列番号161）

【０５９２】

他の態様において、多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は、次の例示の配列などのSaCas9にまたは変改されたPAM特異性を有するSpCas9ニッカーゼに基づき得る：

【表３２－１】

SACAS9－M-MLV RTプライム編集因子	MKRTADGSEFESPKKKRKVGKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDA GVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTD HSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDT GNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYV KEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDI KEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENE KLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFT NLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELT

【表３２－２】

	QEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKK VDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAR EKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDM QEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLVKQEE ASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEE RDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSING GFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKK VMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVD KKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPE KLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKD NGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDN GVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIASFYN NDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKT IASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGSGGSSGGSSGSETPGTS ESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWA ETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQ GILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPY NLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQ LTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATS ELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRW LTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLT KTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYA KGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGK LTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFG PVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWY TDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALK MAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALL KALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTL LIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号162）
SPCAS9（H840A） －VRQR－モロニー マウス白血病ウイルス 逆転写酵素 プライム編集因子	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKK FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEK YPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVK YVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIAN LAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDF QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET GEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDK LIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGIT IMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA

【表３２－３】

	RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHY LDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGG DSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEP DVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMS QEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLR EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQ PLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQH PDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQ KQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCR LFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPD LTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPC LRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARM THYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTR PDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPA GTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGW LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMAD QAARKAAITETPDTSTLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号163）
SPCAS9（H840A）－VRER－モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素プライム編集因子	MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKK FKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEK YPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSD VDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLL AQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDF YPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVK YVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDS VEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFED REMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG KTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIAN LAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMY VDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPS EEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDF QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDV RKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGET GEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDK LIARKKDWDPKKYGGFVSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGIT IMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA RELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHY LDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTN LGAPAAFKYFDTTIDRKEYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPD VSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQ EARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLRE VNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQP LFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHP DLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQ KQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCR

【表３２－４】

	LFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPD LTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPC LRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARM THYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTR PDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPA GTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGW LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMAD QAARKAAITETPDTSTLLIENSSPSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号164）

【０５９３】

さらに他の態様において、本願において企図される多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は、M-MLV逆転写酵素の短縮されたバージョンに融合されたCas9ニッカーゼ(例えば、Cas9(H840A))を包含し得る。この態様では、逆転写酵素は4つの変異をもまた含有する(D200N、T306K、W313F、T330P;PE2に存在するL603W変異は短縮を原因としてもはや存在しないということに注意)。この短縮された編集因子をコードするDNA配列はPE2よりも522bp小さく、よって、DNA配列の送達がそのサイズを原因として難しい適用(すなわち、アデノ随伴ウイルスおよびレンチウイルス送達)にとってそれを可能性として有用にする。この態様はCas9(H840A)-MMLV-RT(trunc)または「短いPE2(PE2-short)」または「PE2-trunc」と言われ、次のアミノ酸配列を有する:

【表３３－１】

CAS9(H840A)－MMLV-RT(TRUNC)または短いPE2	MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPS KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHF LIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAK LQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNT EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSK NGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQ RTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMT NFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFN ASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERL KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILD FLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKG QKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNG RDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRG KSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI TLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYP KLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIV

【表３３－２】

	KKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAY SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYK EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVN FLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVI LADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGS SGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS*TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWL* *SDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHI* *QRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV* *PNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGIS* *GQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATS* *ELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEA* *RKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLF* *NWGPDQQKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQK* *LGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVIL* *APHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPL* *PEEGLQHNCLDNSRLIN*SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV(配列番号765) 凡例: 核局在化の配列(NLS)最前列:(配列番号124)、最後尾:(配列番号133) CAS9(H840A)(配列番号157) 33アミノ酸リンカー1(配列番号127) *M－MLVトランケート型逆転写酵素*(配列番号766)

【０５９４】

図75を見よ。これは、PE2、PE2-trunc、PE3、およびPE3-truncの効率(すなわち、「規定された編集またはインデルを有する配列決定総読取の%」)を種々の細胞株において異なる標的部位について比較する棒グラフを提供する。データは、短縮されたRTバリアントを含むプライム編集因子が、短縮されていないRTタンパク質を含むプライム編集因子と約同じくらい効率的であったということを示す。

【０５９５】

種々の態様において、本願において企図される多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は、PE1、PE2、または上で指示されているプライム編集因子融合体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で開示されている配列のいずれかのバリアントをもまた包含し得る。

【０５９６】

ある態様において、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得る(例えば、逆転写酵素に連結または融合されたnapDNAbp)。

【０５９７】

[5]リンカーおよび他のドメイン

PE融合タンパク質は、napDNAbp(例えば、Cas9ドメイン)およびポリメラーゼドメイン(例えば、RTドメイン)以外に種々の他のドメインを含み得る。例えば、napDNAbpがCas9でありかつポリメラーゼがRTであるケースでは、PE融合タンパク質は、Cas9ドメインをRTドメインと連結する1以上のリンカーを含み得る。リンカーは、他の機能ドメイン、例えば核局在配列(NLS)またはFEN1(または他のフラップエンドヌクレアーゼ)をもまたPE融合タンパク質またはそのドメインに連結し得る。

【０５９８】

加えて、トランスプライム編集が関わる態様では、リンカーが、tPERT動員タンパク

質をプライム編集因子に例えばtPERt動員タンパク質およびnapDNAbpの間において連結するために用いられ得る。例えば、ポリメラーゼドメインおよび動員タンパク質ドメインをnapDNAbpに別個に融合するためのリンカーを包含するトランスプライム編集因子(tPE)の例示の模式図については、図3Gを見よ。

【０５９９】

A．リンカー

上で定められているとおり、本願において用いられる用語「リンカー」は、2つの分子または部分、例えば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言う。いくつかの態様では、リンカーはRNAによってプログラム可能なヌクレアーゼのgRNA結合ドメインおよびポリメラーゼ(例えば、逆転写酵素)の触媒ドメインを連結する。いくつかの態様では、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位置取るかまたはそれらによってフランキングされ、共有結合を介して夫々の1つに接続され、それゆえに2つを接続する。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸または複数のアミノ酸(例えば、ペプチドまたはタンパク質)である。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、リンカーは長さが5-100アミノ酸、例えば、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-150、または150-200アミノ酸である。より長いかまたはより短いリンカーもまた企図される。

【０６００】

リンカーは共有結合ほども単純であり得るか、またはそれは長さが多くの原子であるポリマー性リンカーであり得る。ある態様において、リンカーはポリ(pol)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。ある態様において、リンカーは共有結合である(例えば、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。ある態様において、リンカーはポリマー性である(例えば、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。ある態様において、リンカーはアミノアルカン酸を含む(例えば、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。ある態様において、リンカーは炭素環部分(例えば、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。ある態様において、リンカーはペプチドを含む。ある態様において、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の取り付けを容易化するための官能化された部分を包含し得る(例えば、チオール、アミノ)。いずれかの求電子剤がリンカーの一部として用いられ得る。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。

【０６０１】

いくつか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165)、$(G)_n$(配列番号166)、$(EAAAK)_n$(配列番号167)、$(GGS)_n$(配列番号168)、$(SGGS)_n$(配列番号169)、$(XP)_n$(配列番号170)、またはそれらのいずれかの組み合わせを含み、nは独立して1および30の間の整数であり、Xはいずれかのアミノ酸である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列(GGS)N(配列番号176)を含み、nは1、3、または7である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番

号171)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS(配列番号172)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSGGSGGS(配列番号173)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGS(配列番号174)を含む。他の態様において、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGGSSGGS(配列番号175、60AA)を含む。

【0602】

ある態様において、リンカーは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得る(例えば、逆転写酵素に連結または融合されるnapDNAbp)。

【0603】

上で定められているとおり、本願において用いられる用語「リンカー」は、2つの分子または部分、例えば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言う。いくつかの態様では、リンカーはRNAによってプログラム可能なヌクレアーゼの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。いくつかの態様では、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位置取るかまたはそれらによってフランキングされ、共有結合を介して夫々の1つに接続され、それゆえに2つを接続する。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸または複数のアミノ酸(例えば、ペプチドまたはタンパク質)である。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、リンカーは長さが5～100アミノ酸、例えば、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、30～35、35～40、40～45、45～50、50～60、60～70、70～80、80～90、90～100、100～150、または150～200アミノ酸である。より長いかまたはより短いリンカーもまた企図される。

【0604】

リンカーは共有結合ほども単純であり得るか、またはそれは長さが多くの原子であるポリマー性リンカーであり得る。ある態様において、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。ある態様において、リンカーは共有結合である(例えば、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。ある態様において、リンカーはポリマー性である(例えば、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。ある態様において、リンカーはアミノアルカン酸を含む(例えば、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。ある態様において、リンカーは炭素環部分(例えば、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。ある態様において、リンカーはペプチドを含む。ある態様において、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の取り付けを容易化するための官能化された部分を包含し得る(例えば、チオール、アミノ)。いずれかの求電子剤がリンカーの一部として用いられ得る。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。

【0605】

いくつか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165)、(

G)n(配列番号166)、(EAAAK)$_n$(配列番号167)、(GGS)$_n$(配列番号168)、(SGGS)n(配列番号169)、(XP)n(配列番号170)、またはそれらのいずれかの組み合わせを含み、nは独立して1および30の間の整数であり、Xはいずれかのアミノ酸である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列(GGS)N(配列番号176)を含み、nは1、3、または7である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番号171)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS(配列番号172)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSGGSGGS(配列番号173)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGS(配列番号174)を含む。

【0606】

特に、次のリンカーが、プライム編集因子ドメインを互いと連結するために種々の態様に用いられ得る:

GGS(配列番号767);

GGSGGS(配列番号768);

GGSGGSGGS(配列番号769);

SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSS(配列番号127);

SGSETPGTSESATPES(配列番号171);

SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESAGSYPYDVPDYAGSAAPAAKKKKLDGSGSGGSSGGS(配列番号175)。

【0607】

B. 核局在配列(NLS)

種々の態様において、PE融合タンパク質は1以上の核局在配列(NLS)を含み得、これらは細胞核内へのタンパク質の移行を促進することを助ける。かかる配列は当該技術分野で周知であり、次の例を包含し得る:

【表34－1】

説明	配列	配列番号
SV40 ラージ T-AG の NLS	PKKKRKV	配列番号16
NLS	MKRTADGSEFESPKKKRKV	配列番号124
NLS	MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC	配列番号17
ヌクレオプラスミンの NLS	AVKRPAATKKAGQAKKKKLD	配列番号190
EGL-13 の NLS	MSRRRKANPTKLSENAKKLAKEVEN	配列番号191
C-MYC の NLS	PAAKRVKLD	配列番号192
TUS-タンパク質の NLS	KLKIKRPVK	配列番号193
ポリオーマラージ T-AG の NLS	VSRKRPRP	配列番号194
肝炎 D ウイルス抗原の NLS	EGAPPAKRAR	配列番号195

【表３４－２】

マウスP53のNLS	PPQPKKKPLDGE	配列番号196
PE1およびPE2のNLS	SGGSKRTADGSEFEPKKKRKV	配列番号133

【０６０８】

上のNLS例は限定しない。PE融合タンパク質はいずれかの公知のNLS配列を含み得、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する。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。

【０６０９】

種々の態様において、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子およびプライム編集因子をコードする構築物は、さらに、1以上の、好ましくは少なくとも2つの核局在シグナルを含む。ある態様において、多重フラッププライム編集因子は少なくとも2つのNLSを含む。少なくとも2つのNLSによる態様では、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は多重フラッププライム編集因子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得る。いくつかの態様では、NLSの1以上は双節型NLS(「bpNLS」)である。ある態様において、本開示の融合タンパク質は2つの双節型NLSを含む。いくつかの態様では、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。

【０６１０】

NLS融合の位置付けはプライム編集因子のN末端、C末端、または配列内であり得る(例えば、コードされるnapDNAbp構成要素(例えばCas9)およびポリメラーゼドメイン(例えば逆転写酵素ドメイン)の間に挿入される。

【０６１１】

NLSは当該技術分野のいずれかの公知のNLS配列であり得る。NLSは核局在のためのいずれかの将来に発見されるNLSでもまたあり得る。NLSは、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(例えば、1以上の所望の変異を有するNLS)でもまたあり得る。

【０６１２】

用語「核局在配列」または「NLS」は、例えば核輸送による細胞核へのタンパク質の搬入を促進するアミノ酸配列を言う。核局在配列は当該技術分野で知られており、当業者には明らかであろう。例えば、NLS配列は、2001年5月31日に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に記載されている。これの内容は参照によって本願に組み込まれる。いくつかの態様では、NLSはアミノ酸配列PKKKRKV(配列番号16)、MDSLLMNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLC(配列番号17)、KRTADGSEFESPKKKRKV(配列番号3864)、またはKRTADGSEFEPKKKRKV(配列番号125)を含む。他の態様において、NLSはアミノ酸配列NLSKRPAAIKKAGQAKKKK(配列番号136)、PAAKRVKLD(配列番号192)、RQRRNELKRSF(配列番号3934)、NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(配列番号3935)を含む。

【０６１３】

本開示の一側面において、多重フラッププライム編集因子は、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によって修飾され得る。ある態様において、プライム編集因子は2以上のNLSによって修飾される。本開示は、本開示の時に当該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さも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位置取り得、一般的には、4アミノ酸(Autieri & Agrawal,(1998)J.Biol.Chem.273:14731-37。参照によって本願に組み込まれる)～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。参照によって本願に組み込まれる)。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。例えば、Tinland et al.,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:7442-46;Moede et al.,(1999) FEBS Lett.461:229-34を見よ。これは参照によって組み込まれる。移行は現行では核膜孔タンパク質が関わると考えられる。

【０６１４】

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(PKKKRKV(配列番号16))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(KRXXXXXXXXXXKKKL(配列番号3936))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)非標準的な配列、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)。

【０６１５】

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。それゆえに、本開示は、多重フラッププライム編集因子のC末端、N末端、および内部の領域において1以上のNLSによって修飾され得る多重フラッププライム編集因子を提供する。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、かかる配列は長さおよび組成が機能的に限定され得る。

【０６１６】

本開示は、1以上のNLSを包含するように多重フラッププライム編集因子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、多重フラッププライム編集因子は、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に翻訳的に融合されているプライム編集因子タンパク質を発現するように、すなわちプライム編集因子-NLS融合体構築物を形成するように、操作され得る。他の態様において、プライム編集因子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編集因子の内部の領域に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得る。加えて、NLSは、プライム編集因子とN末端に、C末端に、または内部に、例えばそ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得る。それゆえに、本開示は、プライム編集因子および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、およびホスト細胞をもまた可能にする。

【０６１７】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は核局在シグナルをもまた含み得、これらは、1以上のリンカー、例えばそしてポリマー性、アミノ酸、核酸、多糖、化学的、または核酸リンカー要素を介してプライム編集因子に連結される。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(例えば、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、プライム編集因子および1以上のNLSの間に結合(例えば、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、プライム編集因子に連結され得る。

【０６１８】

C．<u>フラップエンドヌクレアーゼ(例えばFEN1)</u>

種々の態様において、PE融合タンパク質は1以上のフラップエンドヌクレアーゼ(例えばFEN1)を含み得、これは5'一本鎖DNAフラップの除去を触媒する酵素を言う。これらは天然に存在する酵素であり、これらはDNA複製を包含する細胞性のプロセスの間に形成される5'フラップの除去をプロセシングする。本明細書に記載の多重フラッププライム編集法は、多重フラッププライム編集の間に標的部位において形成される内生(endogenouse)DNAの5'フラップを除去するために、内生で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得る。フラップエンドヌクレアーゼは当該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(これら各々は参照により本明細書に組み込まれる)の記載から見出され得る。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３５－１】

説明	配列	配列番号
FEN1 野生型(wt)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF	配列番号198

【表３５－２】

	DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKF TKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVK AGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSR ILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSI EEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKW SEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD DFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	

【０６１９】

フラップエンドヌクレアーゼは、いずれかのFEN1バリアント、変異体、または他のフラップエンドヌクレアーゼオーソログ、ホモログ、もしくはバリアントをもまた包含し得る。限定しないFEN1バリアントの例は次のとおりである:

【表３６－１】

説明	配列	配列番号
FEN1 K168R(FEN1 wt と比べて)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKF TKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALV**R** AGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSR ILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSI EEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKW SEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD DFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	配列番号199
FEN1 S187A(FEN1 wt と比べて)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKF TKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVK AGKVYAAATEDMDCLTFG**A**PVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLS RILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHK SIEEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELK WSEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRL DDFFKVTGSLSSAKRKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	配列番号200
FEN1 K354R(FEN1 wt と比べて)	MGIQGLAKLIADVAPSAIRENDIKSYFGRKVAIDASMSIYQFLI AVRQGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYRTIRMMENGIKPVYVF DGKPPQLKSGELAKRSERRAEAEKQLQQAQAAGAEQEVEKF TKRLVKVTKQHNDECKHLLSLMGIPYLDAPSEAEASCAALVK AGKVYAAATEDMDCLTFGSPVLMRHLTASEAKKLPIQEFHLSR ILQELGLNQEQFVDLCILLGSDYCESIRGIGPKRAVDLIQKHKSI EEIVRRLDPNKYPVPENWLHKEAHQLFLEPEVLDPESVELKW SEPNEEELIKFMCGEKQFSEERIRSGVKRLSKSRQGSTQGRLD DFFKVTGSLSSA**R**RKEPEPKGSTKKKAKTGAAGKFKRGK	配列番号201
GEN1	MGVNDLWQILEPVKQHIPLRNLGGKTIAVDLSLWVCEAQTVK KMMGSVMKPHLRNLFFRISYLTQMDVKLVFVMEGEPPKLKA DVISKRNQSRYGSSGKSWSQKTGRSHFKSVLRECLHMLECLGI PWVQAAGEAEAMCAYLNAGGHVDGCLTNDGDTFLYGAQTV YRNFTMNTKDPHVDCYTMSSIKSKLGLDRDALVGLAILLGCD YLPKGVPGVGKEQALKLIQILKGQSLLQRFNRWNETSCNSSPQ LLVTKKLAHCSVCSHPGSPKDHERNGCRLCKSDKYCEPHDYE	配列番号202

【表３６－２】

	YCCPCEWHRTEHDRQLSEVENNIKKKACCCEGFPFHEVIQEFL LNKDKLVKVIRYQRPDLLLFQRFTLEKMEWPNHYACEKLLVL LTHYDMIERKLGSRNSNQLQPIRIVKTRIRNGVHCFEIEWEKPE HYAMEDKQHGEFALLTIEEESLFEAAYPEIVAVYQKQKLEIKG KKQKRIKPKENNLPEPDEVMSFQSHMTLKPTCEIFHKQNSKLN SGISPDPTLPQESISASLNSLLLPKNTPCLNAQEQFMSSLRPLAI QQIKAVSKSLISESSQPNTSSHNISVIADLHLSTIDWEGTSFSNS PAIQRNTFSHDLKSEVESELSAIPDGFENIPEQLSCESERYTANI KKVLDEDSDGISPEEHLLSGITDLCLQDLPLKERIFTKLSYPQD NLQPDVNLKTLSILSVKESCIANSGSDCTSHLSKDLPGIPLQNE SRDSKILKGDQLLQEDYKVNTSVPYSVSNTVVKTCNVRPPNT ALDHSRKVDMQTTRKILMKKSVCLDRHSSDEQSAPVFGKAK YTTQRMKHSSQKHNSSHFKESGHNKLSSPKIHIKETEQCVRSY ETAENEESCFPDSTKSSLSSLQCHKKENNSGTCLDSPLPLRQRL KLRFQST	
ERCC5	MGVQGLWKLLECSGRQVSPEALEGKILAVDISIWLNQALKGV RDRHGNSIENPHLLTLFHRLCKLLFFRIRPIFVFDGDAPLLKKQ TLVKRRQRKDLASSDSRKTTEKLLKTFLKRQAIKTAFRSKRDE ALPSLTQVRRENDLYVLPPLQEEEKHSSEEEDEKEWQERMNQ KQALQEEFFHNPQAIDIESEDFSSLPPEVKHEILTDMKEFTKRR RTLFEAMPEESDDFSQYQLKGLLKKNYLNQHIEHVQKEMNQ QHSGHIRRQYEDEGGFLKEVESRRVVSEDTSHYILIKGIQAKT VAEVDSESLPSSSKMHGMSFDVKSSPCEKLKTEKEPDATPPSP RTLLAMQAALLGSSSEEELESENRRQARGRNAPAAVDEGSISP RTLSAIKRALDDDEDVKVCAGDDVQTGGPGAEEMRINSSTEN SDEGLKVRDGKGIPFTATLASSSVNSAEEHVASTNEGREPTDS VPKEQMSLVHVGTEAFPISDESMIKDRKDRLPLESAVVRHSDA PGLPNGRELTPASPTCTNSVSKNETHAEVLEQQNELCPYESKF DSSLLSSDDETKCKPNSASEVIGPVSLQETSSIVSVPSEAVDNV ENVVSFNAKEHENFLETIQEQQTTESAGQDLISIPKAVEPMEID SEESESDGSFIEVQSVISDEELQAEFPETSKPPSEQGEEELVGTR EGEAPAESESLLRDNSERDDVDGEPQEAEKDAEDSLHEWQDI NLEELETLESNLLAQQNSLKAQKQQQERIAATVTGQMFLESQ ELLRLFGIPYIQAPMEAEAQCAILDLTDQTSGTITDDSDIWLFG ARHVYRNFFNKNKFVEYYQYVDFHNQLGLDRNKLINLAYLL GSDYTEGIPTVGCVTAMEILNEFPGHGLEPLLKFSEWWHEAQ KNPKIRPNPHDTKVKKKLRTLQLTPGFPNPAVAEAYLKPVVDD SKGSFLWGKPDLDKIREFCQRYFGWNRTKTDESLFPVLKQLD AQQTQLRIDSFFRLAQQEKEDAKRIKSQRLNRAVTCMLRKEK EAAASEIEAVSVAMEKEFELLDKAKRKTQKRGITNTLEESSSL KRKRLSDSKRKNTCGGFLGETCLSESSDGSSSEDAESSSLMNV QRRTAAKEPKTSASDSQNSVKEAPVKNGGATTSSSSDSDDDG GKEKMVLVTARSVFGKKRRKLRRARGRKRKT	配列番号203

【０６２０】

種々の態様において、本願において企図される多重フラッププライム編集因子融合タンパク質は、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アントを包含し得る。

【０６２１】

5'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得る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包含するが、これらに限定されない(例えば、Keijzers et al.,Biosci Rep.2015,35(3):e00206)。

【０６２２】

Trex2

3' 3プライム修復エキソヌクレアーゼ2(TREX2)－ヒト

【０６２３】
受託番号ＮＭ＿０８０７０１
ＭＳＥＡＰＲＡＥＴＦＶＦＬＤＬＥＡＴＧＬＰＳＶＥＰＥＩＡＥＬＳＬＦＡＶＨＲＳＳＬＥＮＰＥＨＤＥＳＧＡＬＶＬＰＲＶＬＤ
ＫＬＴＬＣＭＣＰＥＲＰＦＴＡＫＡＳＥＩＴＧＬＳＳＥＧＬＡＲＣＲＫＡＧＦＤＧＡＶＶＲＴＬＱＡＦＬＳＲＱＡＧＰＩＣＬＶＡ
ＨＮＧＦＤＹＤＦＰＬＬＣＡＥＬＲＲＬＧＡＲＬＰＲＤＴＶＣＬＤＴＬＰＡＬＲＧＬＤＲＡＨＳＨＧＴＲＡＲＧＲＱＧＹＳＬＧ
ＳＬＦＨＲＹＦＲＡＥＰＳＡＡＨＳＡＥＧＤＶＨＴＬＬＬＩＦＬＨＲＡＡＥＬＬＡＷＡＤＥＱＡＲＧＷＡＨＩＥＰＭＹＬＰＰ
ＤＤＰＳＬＥＡ(配列番号３８６５)。
【０６２４】
３' ３プライム修復エキソヌクレアーゼ２(ＴＲＥＸ２)－マウス
【０６２５】
受託番号ＮＭ＿０１１９０７
【０６２６】
ＭＳＥＰＰＲＡＥＴＦＶＦＬＤＬＥＡＴＧＬＰＮＭＤＰＥＩＡＥＩＳＬＦＡＶＨＲＳＳＬＥＮＰＥＲＤＤＳＧＳＬＶＬＰＲＶＬＤ
ＫＬＴＬＣＭＣＰＥＲＰＦＴＡＫＡＳＥＩＴＧＬＳＳＥＳＬＭＨＣＧＫＡＧＦＮＧＡＶＶＲＴＬＱＧＦＬＳＲＱＥＧＰＩＣＬＶ
ＡＨＮＧＦＤＹＤＦＰＬＬＣＴＥＬＱＲＬＧＡＨＬＰＱＤＴＶＣＬＤＴＬＰＡＬＲＧＬＤＲＡＨＳＨＧＴＲＡＱＧＲＫＳＹＳ
ＬＡＳＬＦＨＲＹＦＱＡＥＰＳＡＡＨＳＡＥＧＤＶＨＴＬＬＬＩＦＬＨＲＡＰＥＬＬＡＷＡＤＥＱＡＲＳＷＡＨＩＥＰＭＹＶ
ＰＰＤＧＰＳＬＥＡ(配列番号３８６６)。
【０６２７】
３' ３プライム修復エキソヌクレアーゼ２(ＴＲＥＸ２)－ラット
【０６２８】
受託番号ＮＭ＿００１１０７５８０
【０６２９】
ＭＳＥＰＬＲＡＥＴＦＶＦＬＤＬＥＡＴＧＬＰＮＭＤＰＥＩＡＥＩＳＬＦＡＶＨＲＳＳＬＥＮＰＥＲＤＤＳＧＳＬＶＬＰＲＶＬＤ
ＫＬＴＬＣＭＣＰＥＲＰＦＴＡＫＡＳＥＩＴＧＬＳＳＥＧＬＭＮＣＲＫＡＡＦＮＤＡＶＶＲＴＬＱＧＦＬＳＲＱＥＧＰＩＣＬＶ
ＡＨＮＧＦＤＹＤＦＰＬＬＣＴＥＬＱＲＬＧＡＨＬＰＲＤＴＶＣＬＤＴＬＰＡＬＲＧＬＤＲＶＨＳＨＧＴＲＡＱＧＲＫＳＹＳ
ＬＡＳＬＦＨＲＹＦＱＡＥＰＳＡＡＨＳＡＥＧＤＶＮＴＬＬＬＩＦＬＨＲＡＰＥＬＬＡＷＡＤＥＱＡＲＳＷＡＨＩＥＰＭＹＶ
ＰＰＤＧＰＳＬＥＡ(配列番号３８６７)。
【０６３０】
ＥｘｏＩ
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、ＭｕｔＳα(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。
【０６３１】
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)、転写産物バリアント３)－アイソフォームＡ
ＭＧＩＱＧＬＬＱＦＩＫＥＡＳＥＰＩＨＶＲＫＹＫＧＱＶＶＡＶＤＴＹＣＷＬＨＫＧＡＩＡＣＡＥＫＬＡＫＧＥＰＴＤＲＹＶＧ
ＦＣＭＫＦＶＮＭＬＬＳＨＧＩＫＰＩＬＶＦＤＧＣＴＬＰＳＫＫＥＶＥＲＳＲＲＥＲＲＱＡＮＬＬＫＧＫＱＬＬＲＥＧＫＶＳＥ
ＡＲＥＣＦＴＲＳＩＮＩＴＨＡＭＡＨＫＶＩＫＡＡＲＳＱＧＶＤＣＬＶＡＰＹＥＡＤＡＱＬＡＹＬＮＫＡＧＩＶＱＡＩＩＴＥＤＳ
ＤＬＬＡＦＧＣＫＫＶＩＬＫＭＤＱＦＧＮＧＬＥＩＤＱＡＲＬＧＭＣＲＱＬＧＤＶＦＴＥＥＫＦＲＹＭＣＩＬＳＧＣＤＹＬＳＳ
ＬＲＧＩＧＬＡＫＡＣＫＶＬＲＬＡＮＮＰＤＩＶＫＶＩＫＫＩＧＨＹＬＫＭＮＩＴＶＰＥＤＹＩＮＧＦＩＲＡＮＮＴＦＬＹＱＬＶ
ＦＤＰＩＫＲＫＬＩＰＬＮＡＹＥＤＤＶＤＰＥＴＬＳＹＡＧＱＹＶＤＤＳＩＡＬＱＩＡＬＧＮＫＤＩＮＴＦＥＱＩＤＤＹＮＰＤＴ

AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSIWHRNYSPRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSAELSEDDLLSQYSLSFTKKTKKNSSEGNKSLSFSEVFV
PDLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVPGTRSRFFCSSDSTDCVS
NKVSIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVDTDVARNSSDDIPNNHIPGDHIP
DKATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLGTLRSCFSWSGGLGDFSRTPSPSPSTALQQF
RRKSDSPTSLPENNMSDVSQLKSEESSDDESHPLREEACSSQSQESGEFSLQSSNASK
LSQCSSKDSDSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADS
LSTTKIKPLGPARASGLSKKPASIQKRKHHNAENKPGLQIKLNELWKNFGFKKF(配列
番号3868)。

【０６３２】

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)、転写産物バリアント3)－アイソフォームB

【０６３３】

MGIQGLLQFIKEASEPIHVRKYKGQVVAVDTYCWLHKGAIACAEKLAKGEPTDRYVG
FCMKFVNMLLSHGIKPILVFDGCTLPSKKEVERSRRERRQANLLKGKQLLREGKVSE
ARECFTRSINITHAMAHKVIKAARSQGVDCLVAPYEADAQLAYLNKAGIVQAIITEDS
DLLAFGCKKVILKMDQFGNGLEIDQARLGMCRQLGDVFTEEKFRYMCILSGCDYLSS
LRGIGLAKACKVLRLANNPDIVKVIKKIGHYLKMNITVPEDYINGFIRANNTFLYQLV
FDPIKRKLIPLNAYEDDVDPETLSYAGQYVDDSIALQIALGNKDINTFEQIDDYNPDT
AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSIWHRNYSPRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSAELSEDDLLSQYSLSFTKKTKKNSSEGNKSLSFSEVFV
PDLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVPGTRSRFFCSSDSTDCVS
NKVSIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVDTDVARNSSDDIPNNHIPGDHIP
DKATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLGTLRSCFSWSGGLGDFSRTPSPSPSTALQQF
RRKSDSPTSLPENNMSDVSQLKSEESSDDESHPLREEACSSQSQESGEFSLQSSNASK
LSQCSSKDSDSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADS
LSTTKIKPLGPARASGLSKKPASIQKRKHHNAENKPGLQIKLNELWKNFGFKKDSEK
LPPCKKPLSPVRDNIQLTPEAEEDIFNKPECGRVQRAIFQ(配列番号3869)。

【０６３４】

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)、転写産物バリアント4)－アイソフォームC

【０６３５】

MGIQGLLQFIKEASEPIHVRKYKGQVVAVDTYCWLHKGAIACAEKLAKGEPTDRYVG
FCMKFVNMLLSHGIKPILVFDGCTLPSKKEVERSRRERRQANLLKGKQLLREGKVSE
ARECFTRSINITHAMAHKVIKAARSQGVDCLVAPYEADAQLAYLNKAGIVQAIITEDS
DLLAFGCKKVILKMDQFGNGLEIDQARLGMCRQLGDVFTEEKFRYMCILSGCDYLSS
LRGIGLAKACKVLRLANNPDIVKVIKKIGHYLKMNITVPEDYINGFIRANNTFLYQLV
FDPIKRKLIPLNAYEDDVDPETLSYAGQYVDDSIALQIALGNKDINTFEQIDDYNPDT
AMPAHSRSHSWDDKTCQKSANVSSIWHRNYSPRPESGTVSDAPQLKENPSTVGVER
VISTKGLNLPRKSSIVKRPRSELSEDDLLSQYSLSFTKKTKKNSSEGNKSLSFSEVFVP
DLVNGPTNKKSVSTPPRTRNKFATFLQRKNEESGAVVVPGTRSRFFCSSDSTDCVSN
KVSIQPLDETAVTDKENNLHESEYGDQEGKRLVDTDVARNSSDDIPNNHIPGDHIPD
KATVFTDEESYSFESSKFTRTISPPTLGTLRSCFSWSGGLGDFSRTPSPSPSTALQQFR
RKSDSPTSLPENNMSDVSQLKSEESSDDESHPLREEACSSQSQESGEFSLQSSNASKL
SQCSSKDSDSEESDCNIKLLDSQSDQTSKLRLSHFSKKDTPLRNKVPGLYKSSSADSL
STTKIKPLGPARASGLSKKPASIQKRKHHNAENKPGLQIKLNELWKNFGFKKDSEKL
PPCKKPLSPVRDNIQLTPEAEEDIFNKPECGRVQRAIFQ(配列番号3870)。

【０６３６】

D．<u>インテインおよび分裂インテイン</u>

いくつかの態様では(例えば、AAV粒子を用いるin vivoの多重フラッププライム編集

因子の送達)、ポリペプチド(例えば、デアミナーゼまたはnapDNAbp)または融合タンパク質(例えば多重フラッププライム編集因子)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り得る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、夫々が、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インタグを含み得る。

【０６３７】

分裂インテイ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。分裂インテインは、夫々Nインテインおよびcインテインという名称の2つのピースへと分裂された本質的に一続きのインテイン(例えばミニインテイン)である。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、一続きのインテイ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。分裂インテインは天然に見出され、実験室でもまた操作されている。本願において用いられる用語「分裂インテイン」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インを言い、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イ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インまたはそのフラグメントが、本発明の方法への使用のための分裂インテインを導出するために用いられ得る。例えば、一側面において、分裂インテインは真核生物インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは細菌インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは古細菌インテインに由来し得る。好ましくは、そのように導出された分裂インテインは、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。

【０６３８】

本願において用いられる「N末端分裂インテイン(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イン配列を言う。Inは、それゆえに、トランススプライシングが生起するとき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イン配列のN末端部分の改変である配列を含み得る。例えば、かかる追加のおよび/または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よび/または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。

【０６３９】

本願において用いられる「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言う。一側面において、Icは、それが由来したインテインの最後のβ鎖からである一続きの4～7アミノ酸残基、少なくとも4アミノ酸を含む。Icは、それゆえに、トランススプライシングが生起するとき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、かかる追加のおよび/または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。

【０６４０】

本発明のいくつかの態様では、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)」が存在するときには、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。本願において用いられる「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ときに留まる分裂インテインのアミノ酸配列の部分を言う。ある態様において、InはISPを含む。別の態様では、IcはISPを含む。さらに別の態様では、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。

【０６４１】

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生出され得る。分裂の生出が、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ーが存在し得る。

【０６４２】

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(例えばマイクロモル)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。

【０６４３】

例示の配列は次のとおりである:

【表３７－１】

名称	リガンド依存性インテインの配列
2-4 インテイン:	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVV HNC(配列番号8)
3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYTNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC(配列番号9)
30R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ

【表３７－２】

	AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号10）
30R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号11）
30R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号12）
37R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYNPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号13）
37R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号14）
37R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC（配列番号15）

【０６４４】

インテインは最も頻繁には一続きのドメインとして見出されるが、いくつかは天然に分裂された形態で存在する。このケースでは、2つのフラグメントは別個のポリペプチドとして発現され、スプライシング、いわゆるタンパク質トランススプライシングが生起する前に会合しなければならない。

【０６４５】

例示の分裂インテインはSsp DnaEインテインであり、これは2つのサブユニットつまりDnaE-NおよびDnaE-Cを含む。2つの異なるサブユニットは別個の遺伝子つまりdnaE-nおよびdnaE-cによってコードされ、これらは夫々DnaE-NおよびDnaE-Cサブユニ

ットをコードする。DnaEはSynechocytis sp. PCC6803の天然に存在する分裂インテインであり、夫々がDnaE-NまたはDnaE-Cどちらかとの融合体を含む2つの別個のタンパク質のトランススプライシングを導くことができる。

【０６４６】

追加の天然に存在するまたは操作された分裂インテイン配列は当該技術分野において公知であるか、または本明細書に記載の丸ごとのインテイン配列もしくは当該技術分野で利用可能なものから作られ得る。分裂インテイン配列の例は、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 Nostc punctiforme,FEBS Lett,580:1853-1858に見出され得る。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。追加の分裂インテイン配列は例えばWO2013/045632、WO2014/055782、WO2016/069774、およびEP2877490に見出され得る。これらの夫々の内容は参照によって本願に組み込まれる。

【０６４７】

加えて、トランス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.,[0076]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.Biolmol.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経過して機能的な産物を形成する2つの不活性なフラグメントとして、あるタンパク質を発現するための機会を提供する。例えば、2つの別個に発現される半分からの完全なPE融合タンパク質の形成について、図66および67に示されているとおりである。

【０６４８】

E．<u>RNA-タンパク質相互作用ドメイン</u>

種々の態様において、2つの別個のタンパク質ドメイン(例えば、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得る。かかるシステムは、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、例えば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、多重フラッププライム編集因子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編集因子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。それゆえに、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。

【０６４９】

他のモジュラーなRNA-タンパク質相互作用ドメインの総説は当該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 ta

rget 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に記載されている。これらの夫々はそれらの全体が参照によって本願に組み込まれる。他のシステムは、特異的にPCPタンパク質を動員するPP7ヘアピン、および特異的にComタンパク質を動員する「com」ヘアピンを包含する。Zalatan et al.を見よ。

【０６５０】

MS2ヘアピン(または「MS2アプタマー」とも等価に称される)のヌクレオチド配列は:
GCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCC(配列番号3871)である。

【０６５１】

MCPまたはMS2cpのアミノ酸配列は:
GSASNFTQFVLVDNGGTGDVTVAPSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRKYTIKVEVPKVATQTVGGEELPVAGWRSYLNMELTIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANSGIY(配列番号764)である。

【０６５２】

F. UGIドメイン

他の態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は1以上のウラシルグリコシラーゼ阻害剤ドメインを含み得る。本願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言う。いくつかの態様では、UGIドメインは、野生型UGIまたは配列番号3873で明示されるUGIを含む。いくつかの態様では、本願において提供されるUGIタンパク質は、UGIのフラグメント、およびUGIまたはUGIフラグメントに対して相同的なタンパク質を包含する。例えば、いくつかの態様では、UGIドメインは、配列番号3873で明示されるアミノ酸配列のフラグメントを含む。いくつかの態様では、UGIフラグメントは、配列番号3873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。いくつかの態様では、UGIは、配列番号3873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3873で明示されるアミノ酸配列のフラグメントに対して相同的なアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、UGIもしくはUGIのフラグメントまたはUGIもしくはUGIフラグメントのホモログを含むタンパク質は、「UGIバリアント」と言われる。UGIバリアントはUGIまたはそのフラグメントに対する相同性を共有する。例えば、UGIバリアントは、野生型UGIまたは配列番号3873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。いくつかの態様では、UGIバリアントは、フラグメントが野生型UGIまたは配列番号3873で明示されるUGIの対応するフラグメントと少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、少なくとも99.5%同一、または少なくとも99.9%であるようにして、UGIのフラグメントを含む。いくつかの態様では、UGIは次のアミノ酸配列を含む:

【０６５３】

ウラシル-DNAグリコシラーゼインヒビター:

【０６５４】

＞sp┆P14739┆UNGI_BPPB2
MTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKML(配列番号3873)。

【０６５５】
本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は1より多くのUGIドメインを含み得、これらは本明細書に記載の1以上のリンカーによって分離され得る。
【０６５６】
G．追加のPEエレメント
ある態様において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は塩基修復の阻害剤を含み得る。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言う。いくつかの態様では、IBRはOGG塩基除去修復の阻害剤である。いくつかの態様では、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、hNEIL1、T7 EndoI、T4PDG、UDG、hSMUG1、およびhAAGの阻害剤を包含する。いくつかの態様では、IBRはEndo VまたはhAAGの阻害剤である。いくつかの態様では、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アントであり得るiBERである。いくつかの態様では、IBRは、TDG阻害剤、MBD4阻害剤、またはAlkBH酵素の阻害剤であり得るiBERである。いくつかの態様では、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3872(ヒトTDG)のN140A変異体である。
【０６５７】
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アントは、本開示で提供される多重フラッププライム編集因子のnapDNAbpまたはポリメラーゼドメインに融合され得るiBERである。
【０６５８】
OGG(ヒト)
【０６５９】
MPARALLPRRMGHRTLASTPALWASIPCPRSELRLDLVLPSGQSFRWREQSPAHWSGVLADQVWTLTQTEEQLHCTVYRGDKSQASRPTPDELEAVRKYFQLDVTLAQLYHHWGSVDSHFQEVAQKFQGVRLLRQDPIECLFSFICSSNNNIARITGMVERLCQAFGPRLIQLDDVTYHGFPSLQALAGPEVEAHLRKLGLGYRARYVSASARAILEEQGGLAWLQQLRESSYEEAHKALCILPGVGTKVADCICLMALDKPQAVPVDVHMWHIAQRDYSWHPTTSQAKGPSPQTNKELGNFFRSLWGPYAGWAQAVLFSADLRQSRHAQEPPAKRRKGSKGPEG(配列番号3937)
【０６６０】
MPG(ヒト)
【０６６１】
MVTPALQMKKPKQFCRRMGQKKQRPARAGQPHSSSDAAQAPAEQPHSSSDAAQAPCPRERCLGPPTTPGPYRSIYFSSPKGHLTRLGLEFFDQPAVPLARAFLGQVLVRRLPNGTELRGRIVETEAYLGPEDEAAHSRGGRQTPRNRGMFMKPGTLYVYIIYGMYFCMNISSQGDGACVLLRALEPLEGLETMRQLRSTLRKGTASRVLKDRELCSGPSKLCQALAINKSFDQRDLAQDEAVWLERGPLEPSEPAVVAAARVGVGHAGEWARKPLRFYVRGSPWVSVVDRVAEQDTQA(配列番号3938)
【０６６２】
MBD4(ヒト)
【０６６３】
MGTTGLESLSLGDRGAAPTVTSSERLVPDPPNDLRKEDVAMELERVGEDEEQMMIKRSSECNPLLQEPIASAQFGATAGTECRKSVPCGWERVVKQRLFGKTAGRFDVYFISPQGLKFRSKSSLANYLHKNGETSLKPEDFDFTVLSKRGIKSRYKDCSMAALTSHLQNQSNNSNWNLRTRSKCKKDVFMPPSSSSELQESRGLSNFTSTHLLLKEDEGVDDVNFRKVRKPKGKVTILKGIPIKKTKKGCRKSCSGFVQSDSKRESVCNKADAESEPVAQKSQLD

RTVCISDAGACGETLSVTSEENSLVKKKERSLSSGSNFCSEQKTSGIINKFCSAKDSEH
NEKYEDTFLESEEIGTKVEVVERKEHLHTDILKRGSEMDNNCSPTRKDFTGEKIFQED
TIPRTQIERRKTSLYFSSKYNKEALSPPRRKAFKKWTPPRSPFNLVQETLFHDPWKL
LIATIFLNRTSGKMAIPVLWKFLEKYPSAEVARTADWRDVSELLKPLGLYDLRAKTI
VKFSDEYLTKQWKYPIELHGIGKYGNDSYRIFCVNEWKQVHPEDHKLNKYHDWLW
ENHEKLSLS(配列番号3871)

【0664】

TDG(ヒト)

【0665】

MEAENAGSYSLQQAQAFYTFPFQQLMAEAPNMAVVNEQQMPEEVPAPAPAQEPVQ
EAPKGRKRKPRTTEPKQPVEPKKPVESKKSGKSAKSKEKQEKITDTFKVKRKVDRFN
GVSEAELLTKTLPDILTFNLDIVIIGINPGLMAAYKGHHYPGPGNHFWKCLFMSGLS
EVQLNHMDDHTLPGKYGIGFTNMVERTTPGSKDLSSKEFREGGRILVQKLQKYQPRI
AVFNGKCIYEIFSKEVFGVKVKNLEFGLQPHKIPDTETLCYVMPSSSARCAQFPRAQD
KVHYYIKLKDLRDQLKGIERNMDVQEVQYTFDLQLAQEDAKKMAVKEEKYDPGYEA
AYGGAYGENPCSSEPCGFSSNGLIESVELRGESAFSGIPNGQWMTQSFTDQIPSFSNH
CGTQEQEEESHA(配列番号3872)

【0666】

いくつかの態様では、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インを含み得る(例えば、プライム編集因子構成要素に加えて、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み得る。存在し得る他の例示の特色は、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。

【0667】

多重フラッププライム編集因子またはその構成要素(例えば、napDNAbpドメイン、ポリメラーゼドメイン、またはNLSドメイン)を融合するために用いられ得るタンパク質ドメインの例は、限定なしに、エピトープタグ、およびレポーター遺伝子配列を包含する。エピトープタグの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-5-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。多重フラッププライム編集因子は、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フラグメントをコードする遺伝子配列に融合され得、マルトース結合タンパク質(MBP)、Sタグ、Lex A DNA結合ドメイン(DBD)融合体、GAL4 DNA結合ドメイン融合体、および単純ヘルペスウイルス(HSV)BP16タンパク質融合体を包含するがこれらに限定されない。プライム編集因子の一部を形成し得る追加のドメインは2011年3月11日公開のUS特許公開No.2011/0059502に記載され、その全体が参照によって本願に組み込まれる。

【0668】

本開示のある側面では、グルタチオン-5-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改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、細胞に導入され得る。本開示のある態様において、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では、遺伝子産物の発現は減少させられる。

【０６６９】

本願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タグともまた言われるポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質(MBP)タグ、nusタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)タグ、チオレドキシンタグ、Sタグ、Softag(例えば、Softag 1、Softag 3)、strepタグ、ビオチンリガーゼタグ、FlAsHタグ、V5タグ、およびSBPタグを包含するが、これらに限定されない。追加の好適な配列は当業者には明らかであろう。いくつかの態様では、融合タンパク質は1以上のHisタグを含む。

【０６７０】

本開示のいくつかの態様では、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、多重フラッププライム編集システムの活性は時間的に制御され得る。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得る。2以上のベクターが関わるある種の態様(例えば、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システム)では、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得る。例えば、いくつかの態様では、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を送達し得る。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得る。いくつかの態様では、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。ある態様において、同時に送達されるベクターは、例えば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。さらなる態様では、ベクター上のコード配列から転写されるRNA(例えば、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み得る。いくつかの態様では、RNAの半減期は増大させられ得る。いくつかの態様では、RNAの半減期は減少させられ得る。いくつかの態様では、エレメントはRNAの安定性を増大させることができ得る。いくつかの態様では、エレメントはRNAの安定性を減少させることができ得る。いくつかの態様では、エレメントはRNAの3'UTR内にあり得る。いくつかの態様では、エレメントはポリアデニル化シグナル(PA)を包含し得る。いくつかの態様では、エレメントは、キャップ、例えば上流のmRNAまたはPEgRNA端を包含し得る。いくつかの態様では、RNAはPAを含まずにあり得、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。いくつかの態様では、エレメントは少なくとも1つのAUリッチエレメント(ARE)を包含し得る。組織型、細胞型、タイミング、細胞局在、および環境に依存的である様式で、AREはARE結合タンパク質(ARE-BP)によって結合され得る。いくつかの態様では、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得る。いくつかの態様では、AREは長さが50～150ヌクレオチドを含み得る。いくつかの態様では、AREは少なくとも1コピーの配列AUUUAを含み得る。いくつかの態様では、少なくとも1つのAREがRNAの3'UTRに追加され得る。いくつかの態様では、エレメントはウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)であり得る。

【０６７１】

転写物からの発現を増強するための三次構造を生出する転写後制御エレメント(WPRE)。さらなる態様では、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)に記載されているとおりである。いくつかの態様では、WPREまたは等価物はRNAの3'UTRに追加され得る。いくつかの態様では、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得る。

【０６７２】

いくつかの態様では、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得る。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得る。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渡って生起し得るが、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。

【０６７３】

[6]PEgRNA

本明細書に記載の多重フラッププライム編集システムはいずれかの好適なPEgRNAの使用を企図する。所望のヌクレオチド変化をコードする逆転写(RT)鋳型配列を含む特殊に構成されたガイドRNAの使用によって、プライム標的にプライムされた逆転写(TPRT)の機序は、精密かつ汎用的なCRISPR/Casに基づくゲノム編集を行うことに活用または適合され得る。RT鋳型配列は標準のまたは従来のガイドRNA分子の伸長として提供され得るので、本願はこの特殊に構成されたガイドRNAを「伸長されたガイドRNA」または「PEgRNA」と言う。本願は、二重フラップおよび四重フラッププライム編集における使用のための伸長されたガイドRNAについていずれかの好適な構成または配置を企図する。

【０６７４】

二重フラップおよび多重フラッププライム編集に用いられるpegRNAの一般的なデザインが図92に示されている。二重フラップおよび多重フラッププライム編集に用いられるpegRNAは、古典的なプライム編集に用いられるものに類似のデザインを有するが、RT鋳型領域が標的遺伝子座に対するいずれかの相同性をコードすることは必要ではない。代わりに、2つのpegRNAは、種々の態様において、それらの3'端が互いの逆相補配列である3'フラップの合成をコードするRT鋳型を含有し得る。3'フラップ間のこの相補性は、それらのアニールと、意図される新たなDNA配列による内生DNA配列の置き換えとを促進する。これは、2つのpegRNA上のRT鋳型の5'領域が互いの逆相補配列であるということを要し、相補性のこの量は変わり得る(図92)。

【０６７５】

PEgRNAアーキテクチャ

図3Aは、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子システムに使用可能な伸長されたガイドRNAの一態様を示すが、既存のガイドRNA(緑色部分)は、～20ntプロトスペーサー配列とgRNAコア領域とを包含し、napDNAbpとともに結合する。この態様において、ガイドRNAは、5'末にて伸長されたRNAセグメント、すなわち、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。図1A～1Bに示されるとおり、RTプライマー結合部位の、ニックの後に形成される遊離3'末とのハイブリッドは、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がプライムされる。

【０６７６】

図3Bは、本明細書に開示のプライム編集システムに使用可能な伸長されたガイドRNAの別の態様を示すが、既存のガイドRNA(緑色部分)は、～20ntプロトスペーサー配列とgRNAコアとを包含し、napDNAbpとともに結合する。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。図1C～1Dに示されるとおり、RTプライマー結合部位の、ニックの後に形成される遊離3'末とのハイブリッドは、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がプライムされる。

【０６７７】

図3Cは、本明細書に開示のプライム編集システムに使用可能な、伸長されたガイドRNAの別の態様を示すが、既存のガイドRNA(緑色部分)は、～20ntプロトスペーサー配列とgRNAコアとを包含し、napDNAbpとともに結合する。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がプライムされる。

【０６７８】

一態様において、分子内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、分子内RNA伸長の位置は、gRNAコア中にある。また別の態様において、分子内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。

【０６７９】

一態様において、分子内RNA伸長は、プロトスペーサー配列の3'末から下流に挿入される。別の態様において、分子内RNA伸長は、プロトスペーサー配列の3'末の、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。

【０６８０】

他の態様において、分子内RNA伸長はgRNA中へ挿入され、これは、tracrRNAに対応するかまたはtracrRNAを含むガイドRNAの部分を指し、これはCas9タンパク質またはその等価物(すなわち、異なるnapDNAbp)に結合するかおよび/またはこれと相互作用する。好ましくは、分子内RNA伸長の挿入は、tracrRNA部分とnapDNAbpとの相互作用を妨害しないか、または妨害しても最小限である。

【０６８１】

RNA伸長の長さ(これは少なくとも、RT鋳型およびプライマー結合部位を包含する、例えば図92を見よ)は、いずれの有用な長さでもあり得る。様々な態様において、RNA伸長は、長さが少なくとも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、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【０６８２】

RT鋳型配列はまた、いずれの好適な長さでもあり得る。例えば、RT鋳型配列は、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドであり得る。

【０６８３】

更なる他の態様において、逆転写プライマー結合部位配列は、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチドヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチドヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチドヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチドヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドヌクレオチドである。

【０６８４】

他の態様において、任意のリンカーまたはスペーサー配列は、長さが少なくとも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30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも200ヌクレオチド、少なくとも300ヌクレオチド、少なくとも400ヌクレオチド、または少なくとも500ヌクレオチドである。

【０６８５】

RT鋳型配列は、ある態様において、単鎖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。

【０６８６】

図1Gに描かれるとおり、RT鋳型配列の合成された単鎖DNA産物は、非標的鎖と相同であって、1以上のヌクレオチド変化を含有する。RT鋳型配列の単鎖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生標的鎖配列に取って代わる。取って代わられた内生鎖は、いくつかの態様において、5'内生DNAフラップ種として言及されてもよい(例として、図1Eを参照)。この5'内生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、単鎖DNA産物は、今や内生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生配列と新しく合成された鎖との間にミスマッチが創出される。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。

【０６８７】
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。
【０６８８】
伸長されたガイド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生ＤＮＡ配列に相補的な単鎖ＤＮＡフラップをコードしていてもよく、ここで単鎖ＤＮＡフラップは、所望のヌクレオチド変化を含む。単鎖ＤＮＡフラップは、ニック部位にて内生単鎖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生単鎖ＤＮＡは、5'末を有し、内生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'末内生フラップを除去することが、単鎖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、および単鎖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ところ、5'末内生フラップの切除は、産物形成を推進するのに役立ち得る。
【０６８９】
伸長されたガイドＲＮＡの様々な態様において、単鎖ＤＮＡフラップの細胞修復は、所望のヌクレオチド変化の組み入れをもたらし、これによって所望の産物が形成される。
【０６９０】
なお他の態様において、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組み入れされる。
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～+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、もしくは+1～+125の間である編集窓上に組み入れされる。
【０６９１】
なお他の態様において、所望のヌクレオチド変化は、ニック部位から約+1～+2の間、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、もしくは+1～+20

0である編集窓上に組み入れされる。

【０６９２】

様々な側面において、伸長されたガイドＲＮＡは、ガイドＲＮＡの修飾バージョンである。ガイドＲＮＡは、天然に存在するものであっても、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、当該技術分野において周知である。

【０６９３】

様々な態様において、ガイドＲＮＡ配列の具体的なデザイン側面は、ＰＡＭ配列の場所、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次構造等々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、本明細書に記載の多重フラップ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。

【０６９４】

一般に、ガイド配列は、標的ポリヌクレオチド配列との充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バリアント)の標的配列への配列特異的結合に向けるものである。いくつかの態様において、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性の程度は、好適な整列(ａｌｉｇｎｍｅｎｔ)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。最適な整列は、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、前記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。いくつかの態様において、ガイド配列は、長さが約５、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、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。

【０６９５】

いくつかの態様において、ガイド配列は、長さが約７５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１２ヌクレオチド未満であるか、またはこれらより短い。ガイド配列の、多重フラッププライム編集因子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、多重フラッププライム編集因子の構成要素(試験されるべきガイド配列を包含する)は、本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子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、本明細書に記載のとおりの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、多重フラッププライム編集因子の構成要素(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。

【０６９６】

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。いくつかの態様において、標的配列は、細胞のゲノム内の配列である。例示の標的配列は、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、ゲノム中のユニークな標的配列は、形態ＭＭＭＭＭＭＭＭＭＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＸＧＧ(配列番号２０４)のＣａｓ

9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNNXGG(配列番号205)(Nは、A、G、T、またはCである;およびXは、何であってもよい)。ゲノム中のユニークな標的配列は、形態MMMMMMMMMNNNNNNNNNNNXGG(配列番号206)のS.pyogenes Cas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNXGG(配列番号207)(Nは、A、G、T、またはCである;およびXは、何であってもよい)。S.thermophilus CRISPR1Cas9について、ゲノム中のユニークな標的配列は、形態MMMMMMMMNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号208)のCas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号209)(Nは、A、G、T、またはCである;Xは、何であってもよい;およびWは、AまたはTである)。ゲノム中のユニークな標的配列は、形態MMMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号210)のS.thermophilus CRISPR1 Cas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNXXAGAAW(配列番号211)(Nは、A、G、T、またはCである;Xは、何であってもよい;およびWは、AまたはTである)。S.pyogenes Cas9について、ゲノム中のユニークな標的配列は、形態MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号212)のCas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号213)(Nは、A、G、T、またはCである;およびXは、何であってもよい)。ゲノム中のユニークな標的配列は、形態MMMMMMMMMNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号214)のS.pyogenes Cas9標的部位を包含していてもよく、ここでNNNNNNNNNNNXGGXG(配列番号215)(Nは、A、G、T、またはC;およびXは、何であってもよい)。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、配列をユニークなものとして同定する際に考慮される必要はない。

【０６９７】

別様に指示されない限り、本願においてPEgRNAまたはガイドRNA配列に用いられる文字「T」または「チミン」は、PEgRNAまたはガイドRNA配列をコードするDNA配列上の核酸塩基を指示し、PEgRNAもしくはガイドRNAのウラシル(U)核酸塩基、または当分野において公知のいずれかの化学修飾ウラシル核酸塩基、例えば5-メトキシウラシルを言うことを意図されるということは了解されるべきである。

【０６９８】

いくつかの態様において、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。かかるアルゴリズムの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とおりの、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RNA fold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)。

【０６９９】

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配列の最適な整列の参照によってである。最適な整列は、いずれの好適な整列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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、tracr配列は、長さが約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50ヌクレオチド以上、またはこれらより長い。いくつかの態様において、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(as may alternative sequences)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。好ましい一態様において、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。いくつかの態様において、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、以下のとおりであるが(5'→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、転写ターミネータを表す:(1)NNNNNNNNGTTTTTGTACTCTCAAGATTTAGAAATAAATCTTGCAGAAGCTACAAAGATAAGGCTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCATTTTATGGCAGGGTGTTTTCGTTATTTAATTTTTT(配列番号216);

【0700】

(2)NNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT(配列番号217);

【0701】

(3)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttgtactctcaGAAAtgcagaagctacaaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgtTTTTT(配列番号218);

【0702】

(4)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTT(配列番号219);

【0703】

(5)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtgTTTTTTT(配列番号220);および

【0704】

(6)NNNNNNNNNNNNNNNNNNNgttttagagctagAAATAGcaagttaaaataaggctagtccgttatcaTTTTTTTT(配列番号221)。

【0705】

いくつかの態様において、配列(1)～(3)は、S.thermophilus CRISPR1からのCas9と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、配列(4)～(6)は、S.pyogenesからのCas9と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、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。

【0706】

Cas9ドメインと単鎖DNA結合タンパク質とを含む本明細書に開示のとお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、当業者には明らかであろう。本明細書中、他のどこかでより詳細に説明されるとおり、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。

【０７０７】

いくつかの態様において、ガイドRNAは、構造5'-[ガイド配列]-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU-3'(配列番号222)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。かかる好適なガイドRNA配列は、典型的には、編集されるべき標的ヌクレオチドから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いくつかの例示のガイドRNA配列は、本明細書に提供される。追加のガイド配列は、当該技術分野において周知であり、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子とともに使用され得る。

【０７０８】

他の態様において、PEgRNAは、図3Dに描かれるものを包含する。

【０７０９】

更なる他の態様において、PEgRNAは、図3Eに描かれるものを包含していてもよい。

【０７１０】

図3Dは、本明細書に企図され、例2に定義される方法論に従ってデザインされてもよい、ある態様のPEgRNAの構造を提供する。PEgRNAは、5'→3'方向に順序付けられた3大構成要素、つまり:スペーサー、gRNAコア、および3'末にて伸長アームを含む。伸長アームはさらに、5'→3'方向に以下の構造要素、つまり:プライマー結合部位(A)、編集鋳型(B)、および相同アーム(C)に分けられてもよい。加えて、PEgRNAは、任意の3'末修飾領域(e1)および任意の5'末修飾領域(e2)を含んでいてもよい。またさらに、PEgRNAは、PEgRNAの3'末にて転写終止シグナルを含んでいてもよい(描かれず)。これらの構造要素はさらに本明細書に定義される。PEgRNA構造の描画は、限定することを意図しておらず、要素の配置におけるバリエーションを網羅するものである。例えば、任意の配列修飾因子(e1)および(e2)は、示されるいずれの他の領域内またはそれらの間に位置付けられ得るものであって、3'末および5'末にて位置付けられることに限定され得ない。

【０７１１】

図3Eは、例2に定義される方法論に従ってデザインされてもよい、本明細書に企図される別の態様のPEgRNAの構造を提供する。PEgRNAは、5'→3'方向に順序付けられた3大構成要素、つまり:スペーサー、gRNAコア、および3'末にて伸長アームを含む。伸長アームはさらに、5'→3'方向に以下の構造要素、つまり:プライマー結合部位(A)、編集鋳型(B)、ならびに相同アーム(C)に分けられてもよい。加えて、PEgRNAは、任意の3'末修飾領域(e1)および任意の5'末修飾領域(e2)を含んでいてもよい。またさらに、PEgRNAは、PEgRNAの3'末にて転写終止シグナルを含んでいてもよい(描かれず)。これらの構造要素はさらに本明細書に定義される。PEgRNA構造の描画は、限定することを意図しておらず、要素の配置におけるバリエーションを網羅するものである。例えば、任意の配列修飾因子(e1)および(e2)は、示されるいずれの他の領域内またはそれらの間に位置付けられ得るものであって、3'末および5'末にて位置付けられることに限定され得ない。

【０７１２】

PEgRNAはまた、PEgRNAの特性および/または特徴を修飾してもよい追加のデザイン改善点も包含していてもよく、これによって多重フラッププライム編集の有効性が改善される。様々な態様において、これらの改善点は、数多の種々のカテゴリーの1以上に属するものであってもよく、これらに限定されないが、以下を包含する:(1)非ポリメラーゼIII(pol III)プロモーターからの機能的PEgRNAの効率的な発現を可能にさせるデザイン(これによって厄介な配列要件もなく、より長いPEgRNAの発現が可能になるであろう);(

2)コア、Cas9結合PEgRNA骨格への改善点(これによって有効性が改善され得る);(3)RT処理能力(processivity)を改善する、PEgRNAへの修飾(標的にされたゲノム遺伝子座にてより長い配列の挿入が可能になる);および(4)RNAモチーフの、PEgRNAの5'末端または3'末端への付加(これによって、PEgRNA安定性が改善されるか、RT処理能力が増強されるか、PEgRNAの誤った折り畳みが防止されるか、またはゲノム編集に重要な追加の因子が動員される)。

【０７１３】

一態様において、PEgRNAは、より大きな伸長アームをもつより長い長さのPEgRNAの発現を改善するよう、pol IIIプロモーターでデザインされ得る。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RNAを発現するものであって、核内に保持される短いRNAの発現に有用である。しかしながら、pol IIIは、処理能力がそれほど高くなく、効率的なゲノム編集に要されるレベルにて長さが数百ヌクレオチドより長いRNAを発現することができない。加えて、pol IIIは、伸展したU(streches of U's)にて失速または終止し、PEgRNAを使用して挿入され得る配列多様性を潜在的に限定し得る。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も、それらのより長いsgRNAの発現能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、これによって、発現されたPEgRNA中スペーサーの5'に余分な配列がもたらされ、このことは部位依存的なやり方で著しく低減されたCas9:sgRNA活性をもたらすことが示されている。加えて、pol III転写のPEgRNAは、6～7つ伸びたUにおいて簡単に終止し得るのに対し、pol IIまたはpol Iから転写されたPEgRNAは、異なる終止シグナルを要するであろう。しばしば、かかるシグナルはまた、ポリアデニル化ももたらし、これによってPEgRNAの核からの望ましくない輸送がもたらされるであろう。同様に、pol IIプロモーター(pCMVなど)から発現されるRNAは、典型的には、5'にキャップされており、それらの核外輸送もまたもたらされる。

【０７１４】

これまでに、Rinnおよび共同研究者らは、長鎖非コーディングRNA(lncRNA)でタグ付けされたsgRNAの産生のための様々な発現プラットホームをスクリーニングした[183]。これらのプラットホームは、pCMVから発現され、ヒトのMALAT1 ncRNAからのENE要素[184]、KSHVからのPAN ENE要素[185]、またはU1 snRNAからの3'ボックス[186]において終止するRNAを包含する。注目すべきことに、MALAT1 ncRNAおよびPAN ENEは、ポリAテールを保護する三重ヘリックスを形成する[184,187]。これらの構築物はまた、RNA安定性をも増強し得る。これらの発現系はまた、より長いPEgRNAの発現も可能にさせるであろうことが企図される。

【０７１５】

加えて、一連の方法は、PEgRNAの一部として転写されるであろうpol IIプロモーターの部分の切断のためにデザインされており、自己切断型リボザイム(ハンマーヘッド[188]、ピストル[189]、ハチェット[189]、ヘアピン[190]、VS[191]、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)、または転写されたガイドを処理する他の自己切断型要素、またはCsy4によって認識されまたガイドのプロセシングへも繋がるヘアピン[193]のいずれかが付加されている。また、複数のENEモチーフの組み込みは、これまでKSHV PAN RNAおよび要素について実証されたとおり[185]、改善されたPEgRNA発現および安定性へ繋がり得ることも仮定される。PEgRNAを環状イントロンRNA(ciRNA)の形態に環化することはまた、増強されたRNAの発現および安定性、ならびに核局在化へも繋がり得ることもまた、予想される[194]。

【０７１６】

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とおり、上の様々な要素を包含していてもよい。

【０７１７】

非限定例１－pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNA、およびMALAT1 ENEからなるPEg

RNA発現プラットホーム
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
AATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTAGGGTCATGAAGGTTTTTCTTTTCCTGAGAAAACAACACGTATTGTTTTC
TCAGGTTTTGCTTTTTGGCCTTTTTCTAGCTTAAAAAAAAAAAAAAGCAAAAGATGC
TGGTGGTTGGCACTCCTGGTTTCCAGGACGGGGTTCAAATCCCTGCGGCGTCTTTG
CTTTGACT(配列番号223)
【０７１８】
非限定例2－pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNA、およびPAN ENEからなるPEgRNA発現プラットホーム
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
AATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTGTTTTGGCTGGGTTTTTCCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGA
CGGCAAGGTTTTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATT
TAACGTGCCTAGAGCTCAAATTAAACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACA
TAAATAAAGGTCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(配列番号224)
【０７１９】
非限定例3－pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNA、および3×PAN ENEからなるPEgRNA発現プラットホーム
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
AATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA

CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTTGTTTTGGCTGGGTTTTTCCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGA
CGGCAAGGTTTTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATT
TAACGTGCCTAGAGCTCAAATTAAACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACA
TAAATAAAGGTCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACACTGTTT
TGGCTGGGTTTTTCCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGACGGCAAGGTT
TTTATCCCAGTGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATTTAACGTGCCT
AGAGCTCAAATTAAACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACATAAATAAAGG
TCAATGTTTAATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCTCTCTGTTTTGGCTGGGTT
TTTCCTTGTTCGCACCGGACACCTCCAGTGACCAGACGGCAAGGTTTTTATCCCAG
TGTATATTGGAAAAACATGTTATACTTTTGACAATTTAACGTGCCTAGAGCTCAAA
TTAAACTAATACCATAACGTAATGCAACTTACAACATAAATAAAGGTCAATGTTTA
ATCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAA(配列番号225)

【０７２０】

非限定例４－pCMV、Csy4ヘアピン、PEgRNA、および3'ボックスからなるPEgRNA発現プラットホーム

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT
TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT
CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATG
GGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTC
AATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAA
CTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAG
ACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGT
CTGTTTGTTTCAAAAGTAGACTGTACGCTAAGGGTCATATCTTTTTTTGTTTGGTTT
GTGTCTTGGTTGGCGTCTTAAA(配列番号226)

【０７２１】

非限定例５－pU1、Csy4ヘアピン、PEgRNA、および3'ボックスからなるPEgRNA発現プラットホーム

CTAAGGACCAGCTTCTTTGGGAGAGAACAGACGCAGGGGCGGGAGGGAAAAAGGGA
GAGGCAGACGTCACTTCCCCTTGGCGGCTCTGGCAGCAGATTGGTCGGTTGAGTGG
CAGAAAGGCAGACGGGGACTGGGCAAGGCACTGTCGGTGACATCACGGACAGGGCG
ACTTCTATGTAGATGAGGCAGCGCAGAGGCTGCTGCTTCGCCACTTGCTGCTTCAC
CACGAAGGAGTTCCCGTGCCCTGGGAGCGGGTTCAGGACCGCTGATCGGAAGTGAG
AATCCCAGCTGTGTGTCAGGGCTGGAAAGGGCTCGGGAGTGCGCGGGGCAAGTGAC
CGTGTGTGTAAAGAGTGAGGCGTATGAGGCTGTGTCGGGGCAGAGGCCCAAGATCT
CAGTTCACTGCCGTATAGGCAGGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGT
CGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGTTTCAGCAAGTTCAGAGAAATCTG
AACTTGCTGGATTTTTGGAGCAGGGAGATGGAATAGGAGCTTGCTCCGTCCACTCC
ACGCATCGACCTGGTATTGCAGTACCTCCAGGAACGGTGCACCCACTTTCTGGAGT
TTCAAAAGTAGACTGTACGCTAAGGGTCATATCTTTTTTTGTTTGGTTTGTGTCTTG

GTTGGCGTCTTAAA(配列番号227).

【０７２２】

様々な他の態様において、PEgRNAは、改善点を骨格またはコア配列へ導入することによって改善されてもよい。これは、知られているものを導入することによってなされ得る。

【０７２３】

コア、Cas9結合PEgRNA骨格はおそらく、PE活性を増強するのにも改善され得る。数種のかかるアプローチは既に実証されている。実例として、骨格の第1の対形成要素(P1)は、GTTTT-AAAAC(配列番号3939)対形成要素を含有する。かかるT(複数)の伸びは、RNA転写産物のpol III休止(pausing)および未成熟終止をもたらすことが示されている。このP1の部分におけるT-A対の1つの、G-C対への合理的な突然変異は、sgRNA活性を増強するのが示されたが、このアプローチもまたPEgRNAに対して実現可能であろうことを示唆する[195]。加えて、P1の長さを増大することはまた、sgRNAの折り畳みを増強して改善された活性へ繋がることも示されたが[195]、これはPEgRNA活性の改善のための別の道として示唆される。コアへの改善点の例は以下を包含し得る:

【０７２４】

P1まで6nt伸長を含有するPEgRNA

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGCTCATGAAAATGAGCTAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGTTTTTTT(配列番号228)

【０７２５】

P1内にT-A→G-C突然変異を含有するPEgRNA

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGTTTTTTT(配列番号229)

【０７２６】

様々な他の態様において、PEgRNAは、修飾を編集鋳型領域へ導入することによって改善されてもよい。PEgRNAによって鋳型にされた(templated)挿入のサイズが増大するにつれて、エンドヌクレアーゼによって分解されるか、自発的加水分解を経るか、または折り畳まれることで2次構造(RTによって逆転写され得ないか、もしくはPEgRNA骨格の折り畳みおよびこれに続くCas9-RT結合を妨害する)になるか、になる可能性が高い。結果的に、PEgRNAの鋳型への修飾が、遺伝子全体の挿入などの大きな挿入に影響を及ぼす必要もあり得る。そうするためのいくつかのストラテジーは、合成または半合成PEgRNA内の修飾ヌクレオチドの組み込み(RNAを、分解もしくは加水分解に対してより耐性があるようにさせるか、または阻害性の2次構造を採用する可能性を低くさせる)を包含する[196]。かかる修飾は、Gリッチ配列中のRNA2次構造を低減するであろう、8-アザ-7-デアザグアノシン;分解を低減してある種のRNA2次構造を増強する、ロックド核酸(LNA);RNA安定性を増強する、2'-O-メチル修飾、2'-フルオロ修飾、または2'-O-メトキシエトキシ修飾を包含し得る。かかる修飾はまた、安定性および活性を増強するために、PEgRNA中の他のどこかにも包含され得る。代わりに、または加えて、PEgRNAの鋳型は、所望のタンパク質産物をコードするのとともに、RTによって折り畳まれ得ない単純な2次構造を採用する可能性もまた高くなるように、デザインされ得る。かかる単純な構造は、熱力学的な流し台(sink)として作用するであろうが、これによって逆転写を防止するであろうより複雑な構造が生じる可能性が低くなる。最終的に、鋳型を分裂させて2つ別々のPEgRNAにすることもまたあり得ることである。かかるデザインにおいて、PEは、Cas9と融合したRNA結合タンパク質またはPEgRNA自身上のRNA認識要素(MS2アプタマーなど)を介して、転写を開始すること、また別々の鋳型RNAを標的にされた部位へ動員することにも使用されるであろう。RTは、この別々の鋳型RNAへ直接結合するか、または第2鋳型と入れ替える(swapping to)前に元のPEgRNA上で逆転写を開始するか、のいずれかであり得る。かかるアプローチは、長い鋳型を付加した際にPEgRNAの誤

った折り畳みを予防することのみならず、長い挿入を生じさせるのにゲノムからのCas9の解離(おそらくPEベースの長い挿入を阻害している可能性がある)を要さないことによってもまた、長い挿入を可能にさせ得る。

【０７２７】

更なる他の態様において、PEgRNAは、PEgRNAの5'および3'末端にて、それらの間の位置(例として、gRNAコア領域中もしくはスペーサー中)にてさえも、追加のRNAモチーフを導入することによって改善されることもある。数種のかかるモチーフ－KSHVからのPAN ENEおよびMALAT1からのENEなどを、非pol IIIプロモーターからのより長いPEgRNAの発現を終止させ得る手段として、上に考察した。これらの要素は、ポリAテールを飲み込むRNA三重ヘリックスを形成し、それらの核内への保持をもたらす[184,187]。しかしながら、末端ヌクレオチドを塞ぐ複合体構造をPEgRNAの3'末端にて形成することによって、これらの構造はまた、PEgRNAのエキソヌクレアーゼ媒介分解を予防するのにも役立つ可能性があろう。

【０７２８】

3'末端にて挿入された他の構造要素もまた、非pol IIIプロモーターからの終止を可能にさせることはせずとも、RNA安定性を増強し得る。かかるモチーフは、3'末端を塞ぐであろうヘアピンもしくはRNA四重鎖[197]、または3'末端にて2'-3'-環状ホスファートの形成をもたらし、また潜在的にPEgRNAをエキソヌクレアーゼによって分解される可能性を低くもさせるHDVなどの自己切断型リボザイム[198]を包含し得る。不完全なスプライシングを介してPEgRNAを環化するのに誘導する－ciRNAを形成する－ことはまた、PEgRNA安定性を増大させてPEgRNAが核内に保持されることももたらし得る[194]。

【０７２９】

追加のRNAモチーフはまた、RT処理能力をも改善し得るか、またはDNA-RNA二重鎖へのRTの結合を増強することによってPEgRNA活性をも増強し得る。RTによって結合されるネイティブ配列の、その同族のレトロウイルスゲノム中での付加は、RT活性を増強し得る[199]。これは、レトロウイルスゲノム二量体化および転写開始に関与する、ネイティブプライマー結合部位(PBS)、ポリプリントラクト(PPT)、またはキッシングループを包含し得る[199]。

【０７３０】

二量体化チーフ－キッシングループまたはGNRAテトラループ/テトラループ受容体対[200]など－の、PEgRNAの5'末端および3'末端での付加はまた、PEgRNAの有効な環状化をももたらし得、安定性が改善される。加えて、これらモチーフの付加は、PEgRNAスペーサーとプライマーとの物理的な分離、PE活性の妨げになるであろうスペーサー閉塞への予防を可能にさせ得ることが想像される。スペーサー領域中もしくはプライマー結合部位に沿って小さいトウホールド(toehold)ヘアピンを形成する、PEgRNAへの短い5'伸長もしくは3'伸長はまた、好ましくは、PEgRNAの長さに沿って分子内相補領域のアニーリング(例として、スペーサーとプライマー結合部位との間に生じ得る相互作用)に対しても競合し得る。最終的に、キッシングループはまた、他の鋳型RNAをゲノム部位へ動員するのにも、あるRNAから他のRNAへのRT活性の入れ替えを可能にさせるのにも、使用され得る。様々な2次構造の例示の態様として、図3Dおよび図3Eに描かれるPEgRNAは、示されるとおり伸長アームの末端部分(すなわち、e1およびe2)にあるものを包含する、数多の2次RNA構造(改変されることで、PEgRNAのいずれの領域にもなり得る)を列挙する。

【０７３１】

改善例は、これらに限定されないが、以下を包含する:

【０７３２】

PEgRNA-HDV融合体

GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTGGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACAT

GCTTCGGCATGGCGAATGGGACTTTTTTT(配列番号230)

【０７３３】

PEgRNA-MMLVキッシングループ

GGTGGGAGACGTCCCACCGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATA
GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGT
CCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTGGTGGGAGACGTCCCACCTTTT
TTT(配列番号231)

【０７３４】

PEgRNA-VSリボザイムキッシングループ

GAGCAGCATGGCGTCGCTGCTCACGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTA
GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGA
GTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTCCATCAGTTGACACCCT
GAGGTTTTTTT(配列番号232)

【０７３５】

PEgRNA-GNRAテトラループ/テトラループ受容体

GCAGACCTAAGTGGUGACATATGGTCTGGGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGA
GCTAUACGTAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTUACGAAGTGGGA
CCGAGTCGGTCCTCTGCCATCAAAGCTTCGACCGTGCTCAGTCTGCATGCGATTAG
AAATAATCGCATGTTTTTTT(配列番号233)

【０７３６】

2次RNA-HDV融合体を切り替える(switching)PEgRNA鋳型

TCTGCCATCAAAGCTGCGACCGTGCTCAGTCTGGTGGGAGACGTCCCACCGGCCGG
CATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAA
TGGGACTTTTTTT(配列番号234)

【０７３７】

PEgRNA骨格は、SpCas9およびプライム編集因子の改善のされ方に類似した様式で、指向進化を介してさらに改善され得る。指向進化は、Cas9または進化したCas9バリアントによるPEgRNA認識を増強し得る。加えて、種々のPEgRNA骨格配列はおそらく、種々のゲノム遺伝子座にて最適であって、問題になっている部位にてPE活性を増強するか、オフターゲット活性を低減するか、またはその両方のいずれかであろう。最終的に、他のRNAモチーフが付加されたPEgRNA骨格の進化は、未進化の融合RNAと比べて、融合されたPEgRNAの活性をほぼ必ず改善するであろう。実例として、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へ繋がったが[202]、これは進化がハンマーヘッド-PEgRNA融合体の活性も改善するであろうことを示唆する。加えて、Cas9は現行では一般的にsgRNAの5'伸長を忍容しないが、指向性進化は、蓋然的には、この非忍容性を和らげる有能な変異を生成し、追加のRNAモチーフが利用されることを許すであろう。

【０７３８】

本開示は、ここで開示される多重フラッププライム編集システムの効力をさらに改善するためのいずれかのかかるやり方を企図する。

【０７３９】

連続した一連のTはPEgRNAが転写される容量を限定し得るので、種々の態様においては、伸長アームからのTの連続した配列の出現を限定することが有利であり得る。例えば、少なくとも3つの連続したT、少なくとも4つの連続したT、少なくとも5つの連続したT、少なくとも6つの連続したT、少なくとも7つの連続したT、少なくとも8つの連続したT、少なくとも9つの連続したT、少なくとも10の連続したT、少なくとも11の連続したT、少なくとも12の連続したT、少なくとも13の連続したT、少なくとも14の連続したT、または少なくとも15の連続したTのストリングは、PEgRNAをデザインするときに回避されるべきであるか、または少なくとも最終的なデザインされた配列からは除去されるべきである。1つの態様では、連続したA:T核酸塩基対がリッチである標的部位を回避

する以外に、PEgRNA伸長アーム上の連続したTの欲されないストリングの包含を回避し得る。

【０７４０】

トランスプライム編集のための分裂PEgRNAデザイン

本開示はトランスプライム編集をもまた企図する。これは、PEgRNAを2つの別物の分子:ガイドRNAおよびtPERT分子へと分離することによって作動するプライム編集の改変されたバージョンを言う。tPERT分子は、標的DNA部位においてプライム編集因子複合体と共局在するようにプログラムされ、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型をプライム編集因子にトランスで持って来る。例えば、トランスプライム編集因子(tPE)の態様については図3Gを見よ。これは、(1)動員タンパク質(RP)-PE:gRNA複合体と(2)RNA-タンパク質動員ドメイン(例えば、ステムループまたはヘアピン)に連結されたプライマー結合部位およびDNA合成鋳型を包含するtPERTとを含む2構成要素システムを示す。RP-PE:gRNA複合体の動員タンパク質構成要素は編集されるべき標的部位へとtPERTを動員し、それによって、PBSおよびDNA合成鋳型をプライム編集因子とトランスで会合させる。別の言い方をすると、tPERTは、プライマー結合部位およびDNA合成鋳型を包含するPEgRNAの伸長アーム(の全てまたは一部)を含有するように操作される。このアプローチの1つの利点はPEgRNAの伸長アームをガイドRNAから分離することであり、それによって、伸長アームのPBSとガイドRNAのスペーサー配列との間に生起する傾向があるアニーリング相互作用を最小化する。

【０７４１】

トランスプライム編集の鍵の特色は、トランスプライム編集因子がtPERTをDNA編集の部位へと動員する能力であり、それによってプライム編集の部位においてPEgRNAの機能の全てを有効に共局在させる。動員は、MS2アプタマーなどのRNA-タンパク質動員ドメインをtPERTに組み入れることと、対応する動員タンパク質をRNA-タンパク質動員ドメインに特異的に結合することができるプライム編集因子に(例えば、リンカーを介してnapDNAbpに、またはリンカーリンカーを介してポリメラーゼに)融合することとによって達成され得、それによってtPERT分子をプライム編集因子複合体へと動員する。図3Hに記載されているプロセスに図示されているとおり、RP-PE:gRNA複合体は標的DNA配列に結合およびニッキングする。次いで、動員タンパク質(RP)は、DNA標的部位に結合したプライム編集因子複合体に共局在するようにtPERTを動員し、それによって、tPERT上に位置付けられたプライマー結合部位がニッキングされた鎖上のプライマー配列に結合することを許し、続いてポリメラーゼ(例えばRT)がtPERTの5'端からtPERT上に位置付けられたDNA合成鋳型に対してDNAの一本鎖を合成することを許す。

【０７４２】

tPERTは図3Gおよび図3HにおいてはPBSおよびDNA合成鋳型をRNA-タンパク質動員ドメインの5'端に含むとして示されているが、他の構成のtPERTは、RNA-タンパク質動員ドメインの3'端に位置付けられたPBSおよびDNA合成鋳型を有してデザインされ得る。しかしながら、5’伸長を有するtPERTは、DNAの一本鎖の合成が天然にはtPERTの5'端において終結するであろうという利点を有し、それゆえに、プライム編集のDNA合成ステージの間の鋳型としてRNA-タンパク質動員ドメインのいずれかの部分を用いるリスクがない。

【０７４３】

PEgRNAデザイン方法

本開示はPEgRNAをデザインするための方法にもまた関する。

【０７４４】

デザインの一側面において、デザインアプローチは、プライム編集が用いられようとする具体的な適用を考慮に入れ得る。例えば、本願において例示され論じられるとおり、プライム編集は、限定なしに、(a)変異を修正する変化をヌクレオチド配列に組み入れ、(b)タンパク質およびRNAタグを組み入れ、(c)免疫エピトープを目当てのタンパク質に組み入れ、(d)誘導可能な二量体化ドメインをタンパク質に組み入れ、(e)バイオ分子のそ

の活性を変改するために配列を組み入れまたは除去、(f)特定の遺伝子変化を導くためにリコンビナーゼ標的部位を組み入れ、および(g)エラーを起こしやすいRTを用いることによる標的配列の変異導入をするために用いられ得る。目当ての標的部位におけるヌクレオチド配列を一般的に挿入、変化、または欠失させるこれらの方法に加えて、プライム編集因子は、高度にプログラム可能なライブラリを構築するために、ならびに細胞データ記録および系統トレース研究を行うためにもまた用いられ得る。これらの種々の使用では、本明細書に記載のとおり、これらの適用のいずれかの所与のものにとって特に有用であるPEgRNAの調製に当てはまる具体的なデザイン側面があり得る。

【０７４５】

プライム編集のいずれかの具体的な適用または使用のためのPEgRNAをデザインするときには、いくつもの考慮事項が考慮に入れられ得る。これらは:

(a)1以上の核酸塩基改変がプライム編集因子によって組み入れされることを望まれる標的配列、すなわちヌクレオチド配列;

(b)標的配列上のカットされる部位の位置付け、すなわち、プライム編集因子が一本鎖ニックを誘導して、ニックの1つの側に3'端RTプライマー配列およびニックの他の側に5'端の内生フラップ(これは究極的にはFEN1またはその等価物によって除去され、3'ssDNAフラップによって置き換えられる)を生出するであろう特定の核酸塩基位置。カットされる部位は「編集の位置付け」に類縁である。なぜなら、これは3'端RTプライマー配列を生出し、これはRNA依存的なDNA重合の間にRTによって伸長されるようになって、所望の編集を含有する3'ssDNAフラップを生出し、これが次いで標的配列上の5'内生DNAフラップを置き換えるからである;

(c)利用可能なPAM配列(標準的なSpCas9 PAM部位、および拡張されたまたは異なるPAM特異性を有するCas9バリアントおよび等価物によって認識される非標準的なPAM部位を包含する);

(d)標的配列上の利用可能なPAM配列とカットされる部位の位置付けとの間の間隔;

(e)用いられようとするプライム編集因子の具体的なCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物;

(f)プライマー結合部位の配列および長さ;

(g)編集鋳型の配列および長さ;

(h)相同アームの配列および長さ;

(i)スペーサー配列および長さ;ならびに

(j)コア配列、

を包含するが、これらに限定されない。

【０７４６】

本開示は上のこれらの側面を論ずる。

【０７４７】

1つの態様では、好適なPEgRNAと任意に第2部位ニッキングのためのニッキングsgRNAデザインガイドとをデザインするアプローチが、ここに提供される。この態様は、プライム編集のためのPEgRNAおよびニッキングsgRNAをデザインするための説明書のステップバイステップのセットを提供し、これは上の考慮事項の1以上を考慮に入れる。ステップは図70A-70Iに示されている例を参照する。

1．標的配列および編集を定める。所望の編集(点変異、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせ)の位置付けを中心とした標的DNA領域(～200bp)の配列をリトリーブする。図70Aを見よ。

2．標的PAMを位置付ける。所望の編集位置付けに対して近位のPAMを同定する。PAMは所望の編集位置付けに対して近位のDNAのどちらかの鎖上に同定され得る。編集位置に近接するPAMが好ましいが(すなわち、ニック部位は編集位置から30nt未満である。または編集位置からニック部位まで29nt、28nt、27nt、26nt、25nt、24nt、23nt、22nt、21nt、20nt、19nt、18nt、17nt、16nt、15nt、14nt、13nt、12nt、11nt、10nt、9nt、8nt、7nt、6nt、5nt、4nt、3nt、もしくは2nt未満)、編集

位置から≧30ntのニックを置くプロトスペーサーおよびPAMを用いて編集を組み入れることが可能である。図70Bを見よ。

3．ニック部位を位置付ける。考慮されている各PAMについて、対応するニック部位とどの鎖上かとを同定する。Sp Cas9 H840Aニッカーゼでは、切断はNGG PAMの5'の第3および第4の塩基の間においてPAM含有鎖に生起する。全ての編集されるヌクレオチドはニック部位の3'に存在しなければならない。そのため、適当なPAMはPAM含有鎖上の標的の編集の5'にニックを置かなければならない。下で示される例では、2つの可能なPAMがある。単純のために、残りのステップはPAM 1のみを用いるPEgRNAのデザインを実証する。図70Cを見よ。

4．スペーサー配列をデザインする。Sp Cas9のプロトスペーサーはPAM含有鎖上のNGG PAMの5'の20ヌクレオチドに対応する。効率的なPol III転写開始はGが最初に転写されるヌクレオチドであることを要求する。プロトスペーサーの最初のヌクレオチドがGである場合には、PEgRNAのスペーサー配列は単純にプロトスペーサー配列である。プロトスペーサーの最初のヌクレオチドがGではない場合には、PEgRNAのスペーサー配列は、G、次にプロトスペーサー配列である。図70Dを見よ。

5．プライマー結合部位(PBS)をデザインする。出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のDNAプライマーを同定する。DNAプライマーの3'端はニック部位のちょうど上流のヌクレオチドである(すなわち、Sp Cas9ではNGG PAMの5'の第4の塩基)。PE2およびPE3への使用のための一般的なデザイン原理として、DNAプライマーに対する12～13ヌクレオチドの相補性を含有するPEgRNAプライマー結合部位(PBS)が、～40-60%GC含量を含有する配列に用いられ得る。低いGC含量を有する配列では、より長い(14～15nt)PBSが試験されるべきである。より高いGC含量を有する配列では、より短い(8～11nt)PBSが試験されるべきである。GC含量にかかわらず、最適なPBS配列は経験的に決定されるはずである。長さpのPBS配列をデザインするためには、出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のニック部位の5'の最初のpヌクレオチドの逆相補体を取る。図70Eを見よ。

6．RT鋳型(またはDNA合成鋳型)をデザインする。RT鋳型(または、ポリメラーゼが逆転写酵素ではないところでは、DNA合成鋳型)は、デザインされた編集と編集に隣接する配列に対する相同性とをコードする。1つの態様では、これらの領域は図3Dおよび図3EのDNA合成鋳型に対応し、DNA合成鋳型は「編集鋳型」および「相同アーム」を含む。最適なRT鋳型長さは標的部位に基づいて変わる。ショートレンジ編集(位置+1～+6)では、短い(9～12nt)、中程度の(13～16nt)、および長い(17～20nt)RT鋳型を試験することが推奨される。ロングレンジ編集(位置+7以降)では、十分な3'DNAフラップ相同性を許すように、編集の位置から少なくとも5nt(好ましくは10nt以上)伸長するRT鋳型を用いることが推奨される。ロングレンジ編集では、機能的なデザインを同定するために、いくつかのRT鋳型がスクリーニングされるべきである。より大きい挿入および欠失(≧5nt)では、RT鋳型上へのより多大な3'相同性(～20nt以上)の組み込みが推奨される。RT鋳型が、逆転写されるDNA産物上の最後のヌクレオチドとしてのG(PEgRNAのRT鋳型上のCに対応する)の合成をコードするときには、編集効率は典型的には損なわれる。多くのRT鋳型が効率的なプライム編集を支持するので、RT鋳型をデザインするときには、最後の合成されるヌクレオチドとしてのGの回避が推奨される。長さrのRT鋳型配列をデザインするためには、所望のアレル配列を用い、PAMを元々含有した鎖上のニック部位の3'の最初のrヌクレオチドの逆相補体を取る。SNP編集と比較して、同じ長さのRT鋳型を用いる挿入または欠失編集は同一の相同性を含有しないであろうということに注意せよ。図70Fを見よ。

7．完全なPEgRNA配列をアセンブリする。PEgRNA構成要素を次の順序(5'→3')でコンカテネーションする:スペーサー、骨格、RT鋳型、およびPBS。図70Gを見よ。

8．PE3のためのニッキングsgRNAをデザインする。編集の上流および下流の非編集鎖上のPAMを同定する。最適なニッキング位置は高度に遺伝子座依存的であり、経験的に決定されるはずである。一般的に、PEgRNAによって誘導されるニックの向かいの位

置の40～90ヌクレオチド5'に置かれたニックは、より高い編集収量およびより少数のインデルに至る。ニッキングsgRNAは、出発アレル上の20ntプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有する。プロトスペーサーがGで始まらない場合には5'Gの追加を有する。図70Hを見よ。

9．PE3bニッキングsgRNAをデザインする。PAMが相補鎖に存在し、その対応するプロトスペーサーが編集のために標的化される配列とオーバーラップする場合には、この編集はPE3bシステムの候補であり得る。PE3bシステムでは、ニッキングsgRNAのスペーサー配列は出発アレルではなく所望の編集されたアレルの配列にマッチする。編集されるヌクレオチド(単数または複数)がニッキングsgRNAプロトスペーサーのシード領域(PAMに隣接する～10nt)内に収まるときには、PE3bシステムは効率的に作動する。これは、編集された鎖の組み入れ後まで相補鎖のニッキングを防止し、標的DNAに結合することについてのPEgRNAおよびsgRNAの間の競合を防止する。PE3bは、両鎖上の同時のニックの生成をもまた回避し、それゆえに、高い編集効率を維持しながらインデル形成を有意に縮減する。PE3b sgRNAは、所望のアレルの20ntプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有するはずである。必要とされる場合には5'Gの追加を有する。図70Iを見よ。

【0748】

好適なPEgRNAおよび第2部位ニッキングsgRNAをデザインするための上のステップバイステップのプロセスは、決して限定することを意味されない。本開示は上に記載されているステップバイステップのプロセスのバリエーションを企図し、これらは当業者によって次いで導出可能であろう。

【0749】

[7]多重フラッププライム編集を利用する用途

二重フラップおよび四重フラッププライム編集(すなわち、多重フラッププライム編集)は、ペプチドタグ、RNAタグ、免疫エピトープ、二量体化ドメイン、およびリコンビナーゼ標的部位を組み入れることなどの多くの可能性としての適用を有する。二重フラッププライム編集の1つのかかる適用は、ゲノム上のユーザーによって規定された位置付けにおけるリコンビナーゼまたはインテグラーゼ配列の組み入れである。図93は、2つのニック部位間の90bpの介在配列の同時の欠失を有する、ヒトゲノム(HEK293T部位3またはHEK3)の標的領域上へのBxB1リコンビナーゼattB(38bp)およびattP(50bp)部位の組み入れを例解する。3'フラップ間の種々の度合いの相補性が首尾良い編集を許すが、相補性のより長い配列は、所望の編集対インデルのより好都合な比を生ずる。他の二重フラッププライム編集の適用は、ペプチドもしくはタンパク質配列による遺伝子の内生タグ付け、またはそれらの変異がエキソン配列上に収まる複数のバリアントに置換するポテンシャルを有する新たなDNA配列によるエキソンの置き換えを包含する。

【0750】

二重フラッププライム編集は、ヒトゲノム上の標的位置に1つまたは2つのリコンビナーゼ部位を導入するために用いられ得る。単一のリコンビナーゼ部位が挿入される場合には、これらは、ゲノム上のリコンビナーゼ部位とプラスミドなどの外来的に供給されるDNA上の第2のリコンビナーゼ部位との間のリコンビナーゼによって媒介される反応のための着陸地点として用いられ得る。これはDNAカーゴの標的化された取り入れを可能化する。2つのリコンビナーゼ部位がDNAの隣接領域上に挿入される場合には、リコンビナーゼ部位の向きに依存して、これらは、介在配列のリコンビナーゼによって媒介される切除もしくは逆位のために、またはカーゴ取り入れのための外来的なDNAとのリコンビナーゼによって媒介されるカセット交換のために用いられ得る。異なる染色体上における適合性のリコンビナーゼ部位の取り入れは、標的化されたかつ指向的な染色体転座を可能化する。二重フラッププライム編集は、ヒトゲノム上のいくつもの遺伝子座にリコンビナーゼ部位を効率的に導入するために用いられ得る(図94)。それゆえに、DNAリコンビナーゼ酵素との二重フラッププライム編集によるリコンビナーゼ部位取り入れのペアリングは、多くの型のSV編集およびDNAカーゴの標的取り入れを達成するための強力なアプロー

チを表す。

【０７５１】

本願に記載される多重フラッププライム編集因子(例えば、図90に図示されている態様)は、新たなDNA配列の正確な挿入、内生ゲノムDNA配列の正確な欠失、または新たなDNA配列による内生ゲノムDNA配列の置き換えのために用いられ得る。

【０７５２】

例えば、本明細書に例示され論じられるとおり、二重プライム編集は、(a)変異を修正する変化をヌクレオチド配列に組み入れ、(b)タンパク質およびRNAタグを組み入れ、(c)免疫エピトープを目当てのタンパク質に組み入れ、(d)誘導可能な二量体化ドメインをタンパク質に組み入れ、(e)特定の遺伝子変化を導くためにリコンビナーゼ標的部位を組み入れるために用いられ得る。目当ての標的部位におけるヌクレオチド配列を一般に、挿入、変化、または欠失させるこれらの方法に加えて、二重プライム編集因子は、高度にプログラム可能なライブラリを構築するために、ならびに細胞データ記録および系統トレース研究を行うためにもまた用いられ得る。

【０７５３】

二重プライム編集のこれらの特定の例示の使用は決して限定することを意図されない。本願は、ヌクレオチド配列、例えばゲノムDNA上の標的部位における1以上の核酸塩基の組み入れ、欠失、および/または置き換えの何らかの形態が一般的に関わる二重プライム編集のいずれかの使用を企図する。

【０７５４】

プライム編集の例示されている使用のいずれかについて、PE1、PE2、PE3、およびPE3b、またはPE-shortを包含する本明細書に開示のいずれかのプライム編集因子を用い得る。

【０７５５】

A．プライム編集・対・多重フラッププライム編集

古典的プライム編集

種々の態様において、プライム編集(または「プライム編集」)は、標的DNA分子(これに、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、伸長されたガイドRNAと複合体化した核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)と接触させることによって作動する。図1Gを参照すると、伸長されたガイドRNAは、ガイドRNAの3'もしくは5'端にまたはガイドRNAの分子内の位置付けに伸長を含み、所望のヌクレオチド変化(例えば、1ヌクレオチド変化、挿入、または欠失)をコードする。ステップ(a)では、napDNAbp/伸長されたgRNA複合体がDNA分子に接触し、伸長されたgRNAがnapDNAbpをガイドして標的遺伝子座に結合させる。ステップ(b)では、ニックが標的遺伝子座のDNAの鎖の1つに導入され(例えば、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'端を標的遺伝子座の鎖の1つに生出する。ある態様において、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」上に生出される。しかしながら、ニックは鎖のどちらかに導入され得る。つまり、ニックは、Rループ「標的鎖」(すなわち、伸長されたgRNAのプロトスペーサー配列にハイブリダイズされる鎖)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、標的鎖に対して相補的である鎖)上に導入され得る。ステップ(c)では、DNA鎖の3'端(ニックによって形成される)は、逆転写をプライムするためにガイドRNAの伸長された部分と相互作用する(すなわち「プライム標的にプライムされたRT」)。ある態様において、3'端DNA鎖は、ガイドRNAの伸長された部分の特定のRTプライム配列、すなわち「逆転写酵素プライム配列」にハイブリダイズする。ステップ(d)では、逆転写酵素が導入され(napDNAbpとの融合タンパク質としてまたはトランスで)、これが、プライムされた部位の3'端から伸長されたガイドRNAの5'端の方へDNAの一本鎖を合成する。これは、ニック部位におけるまたはそれに隣接する内生DNAに対してさもなければ相同的である、所望のヌクレオチド変化(例えば、1塩基変化、挿入、もしくは欠失、またはそれらの組み合わせ)を含む一本鎖DNAフラップを形成する。ステップ(e)では、napD

NAbpおよびガイドRNAがリリースされる。ステップ(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、ひとたび3'一本鎖DNAフラップが内生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'内生DNAフラップを除去することによって、所望の産物形成の方へ駆動され得る(例えば、トランスで、プライム編集因子との融合体として提供、または内生で提供されるFEN1または類似の酵素による)。理論によって拘束されることなしに、細胞の内生DNA修復および複製プロセスは、ミスマッチのDNAを分解してヌクレオチド変化(単数または複数)を組み込んで、所望の変改された産物を形成する。プロセスは、図1Gにおいて例示されるとおり「第2鎖ニッキング」または図1Iにおいて例示され本願において論じられるとおり「時間的(termporal)第2鎖ニッキング」によってもまた、産物形成の方へ駆動され得る。

【０７５６】

プライム編集のプロセスは次の遺伝子変化の少なくとも1以上を導入し得る:トランスバージョン、トランジション、欠失、および挿入。加えて、プライム編集は特定の適用のために実装され得る。例えば、本願において例示され論じられるとおり、プライム編集は、(a)変異を修正する変化をヌクレオチド配列に組み入れ、(b)タンパク質およびRNAタグを組み入れ、(c)免疫エピトープを目当てのタンパク質に組み入れ、(d)誘導可能な二量体化ドメインをタンパク質に組み入れ、(e)バイオ分子のその活性を変改するために配列を組み入れまたは除去、(f)特定の遺伝子変化を導くためにリコンビナーゼ標的部位を組み入れ、および(g)エラーを起こしやすいRTを用いることによる標的配列の変異導入をするために用いられ得る。目当ての標的部位におけるヌクレオチド配列を一般的に挿入、変化、または欠失させるこれらの方法に加えて、プライム編集因子は、高度にプログラム可能なライブラリを構築するために、ならびに細胞データ記録および系統トレース研究を行うためにもまた用いられ得る。本発明者らは、プライム編集の効力を改善することを狙うPEgRNAの追加のデザイン特色をもまた企図した。なお、さらに、本発明者らは、インテインドメインを用いてnapDNAbpを分裂することが関わる、ベクター送達システムを用いてプライム編集因子を首尾良く送達するための方法の着想を得た。

【０７５７】

用語「プライム編集システム」または「プライム編集因子(PE)」は、本明細書に記載のプライム標的にプライムされた逆転写(TPRT)を用いるゲノム編集の方法に関わる組成物を言い、napDNAbp、逆転写酵素、融合タンパク質(例えば、DNAbpおよび逆転写酵素を含む)、伸長されたガイドRNA、および融合タンパク質と伸長されたガイドRNAとを含む複合体、ならびに補助的な要素、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鎖ニッキング構成要素および5'内生DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼ(例えばFEN1)を包含するが、これらに限定されない。

【０７５８】

別の態様では、図3Fの模式図は、二本鎖DNAの標的部位との典型的なPEgRNAの相互作用と、目当ての遺伝子変化を含有する3'一本鎖DNAフラップの付随的生産とを図示する。二本鎖DNAは、上側鎖が3'→5'の向きで、下方の鎖が5'→3'の方向で示されている。上側の鎖は「プロトスペーサー」およびPAM配列を含み、「標的鎖」と言われる。相補的な下方の鎖は「非標的鎖」と言われる。示されていないが、図示されているPEgRNAはCas9または等価物と複合体化するであろう。模式図に示されているとおり、PEgRNAのスペーサーは、プロトスペーサーと言われる標的鎖上の相補的な領域にアニーリングし、これはPAM配列のちょうど下流に位置付けられ、長さがおよそ20ヌクレオチドである。この相互作用は、スペーサーRNAおよびプロトスペーサーDNAの間にDNA/RNAハイブリッドを形成し、プロトスペーサーに対向する領域におけるRループの形成を誘導する。本願の他所において教示されるとおり、Cas9タンパク質(示されていない)が、次いで、示されているとおり非標的鎖上にニックを誘導する。次いで、これは3'ssDNAフラップ領域の形成に至り、これは、*z*に従って、プライマー結合部位においてPEgRNAの3'端と相互作用する。ssDNAフラップの3'端(すなわち、逆転写酵素プライマー配列)は

PEgRNA上のプライマー結合部位(A)にアニーリングし、それによって逆転写酵素をプライムする。次に、逆転写酵素(例えば、トランスで提供されるか、またはCas9構築物に取り付けられた融合タンパク質としてシスで提供される)が、次いで、編集鋳型(B)および相同アーム(C)によってコードされるDNAの一本鎖を重合する。重合は伸長アームの5'端の方へ連続する。ssDNAの重合した鎖はssDNA 3'端フラップを形成する。これは、他所に記載されるとおり(例えば図1Gに示されるとおり)、内生DNAに侵入し、対応する内生鎖を押し除け(これは内生DNAの5'DNAフラップとして除去される)、所望のヌクレオチド編集(1ヌクレオチド塩基対変化、欠失、挿入(遺伝子丸ごとを包含する)を天然に存在するDNA修復/複製ラウンドによって組み入れる。

【０７５９】

プライム編集のこの適用はさらに例1で記載され得る。

【０７６０】

二重プライム編集

本明細書は二重プライム編集システム(または二重フラッププライム編集システム)を記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と編集されない相補的なゲノムDNA鎖への編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。二重フラッププライム編集システムでは、2つのpegRNAが用いられて、ゲノム部位の対向する鎖を標的化し、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図91)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、二重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットするプライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた、元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。従って、ある態様において、二重フラッププライム編集システムには、編集されるべき標的部位の内生DNA配列との相同性を共有する新たに合成されるDNA鎖(例えば3'フラップ)のペアが関わる。いくつかの態様において、二重フラッププライム編集システムには、新たに合成されるDNA鎖のペアが関わり、ここで、新たに合成されるDNA鎖の少なくとも1つは、編集されるべき標的部位の内生DNA配列との相同性を共有しない。いくつかの態様において、新たに合成されるDNA鎖の1つは、別の新たに合成されるDNA鎖とのではなく、標的部位の内生DNA配列との相同性を含む。いくつかの態様において、新たに合成されるDNA鎖のそれぞれは、別の新たに合成されるDNA鎖とのではなく、標的部位の内生DNA配列との相同性を含む。例えば、二重フラップpegRNAの1つによってコードされる新たに合成される3'フラップは、別の二重フラップpegRNAのプロトスペーサー配列に対する相補性の領域を含み得る。従って、いくつかの態様において、別のpegRNAのスペーサー配列に対する相補性をそれぞれが有する二重フラップpegRNAのペアは、二重フラップpegRNAのペアのプロトスペーサー配列間に位置する内生DNA配列の欠失をもたらし得る。いくつかの態様において、二重フラッププライム編集システムには、新たに合成されるDNA鎖のペアが関わり、ここで、新たに合成されるDNA鎖のいずれも、編集されるべき標的部位の内生DNA配列との相同性を共有しない。むしろ、2つの新たに合成されるDNA鎖(例えば3'フラップ)はそれぞれが互いに対する相補性の領域を含み、相補性によって二重鎖を形成し得る。次いで、二重鎖上の編集されるべき内生DNA配列標的部位と比較して所望の編集された部分が、標的部位に組み込まれ得る。古典的プライム編集のように、二重プライム編集は多目的のかつ正確なゲノム編集方法である。これは、ポリメラーゼ(すなわち、napDNAbpとの融合タンパク質の形

態の、または別様にトランスで提供される)と関連して働く核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を用いて、規定されたDNA部位に新たな遺伝情報を直接的に書き込み、プライム編集システムは、プライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によってプログラムされる。これは、ガイドRNA上に(例えば、5'もしくは3'端に、またはガイドRNAの内部部分に)操作された伸長(DNAまたはRNAどちらか)によって、標的部位を規定することおよび置き換えDNA鎖の形態の所望の編集の合成の鋳型となること両方をする。所望の編集(例えば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内生鎖と同じ配列を共有する(それが所望の編集を包含することを例外とする)。DNA修復および/または複製機構によって、標的部位の内生鎖は、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。いくつかのケースでは、プライム編集は「探索-と-置き換え」ゲノム編集テクノロジーと考えられ得る。なぜなら、本願に記載されるプライム編集因子は編集されるべき所望の標的部位を探索し位置付けるのみならず、同時に、所望の編集を含有する置き換え鎖をコードし、これが、対応する標的部位の内生DNA鎖に代えて組み入れられるからである。

【０７６１】

B．ペプチドタグ付けのための二重プライム編集の使用

別の側面において、本開示は、プライム編集を用いてタンパク質上に1以上のペプチドタグを遺伝子的にグラフトするために本明細書に記載の二重プライム編集因子を用いるための方法を提供する。より具体的には、本開示は、1以上のペプチドタグをタンパク質上に遺伝子的に組み入れるための方法を提供し:タンパク質をコードする標的ヌクレオチド配列を、1以上のペプチドタグをコードする第2のヌクレオチド配列をその中に挿入するように構成されたプライム編集因子と接触させて、タンパク質タグに融合されたタンパク質を含む融合タンパク質をコードする組み換えヌクレオチド配列をもたらすことを含む。

【０７６２】

他の態様において、本開示は、目当てのペプチドと1以上のペプチドタグとを含む融合タンパク質を作るための方法を提供し、方法は:タンパク質をコードする標的ヌクレオチド配列を、1以上のペプチドタグをコードする第2のヌクレオチド配列をその中に挿入するように構成されたプライム編集因子と接触させて、タンパク質タグに融合されたタンパク質を含む融合タンパク質をコードする組み換えヌクレオチド配列をもたらすことを含む。

【０７６３】

種々の態様において、標的ヌクレオチド配列はゲノムDNA上の目当ての特定の遺伝子である。目当ての遺伝子は目当てのタンパク質をコードし得る(例えば、受容体、酵素、治療学的タンパク質、膜タンパク質、輸送タンパク質、シグナル伝達タンパク質、または免疫学的タンパク質など)。目当ての遺伝子はRNA分子をもまたコードし得、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、リボソームRNA(rRNA)、核内低分子RNA(snRNA)、アンチセンスRNA、ガイドRNA、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびセルフリーRNA(cfRNA)を包含するが、これらに限定されない。

【０７６４】

ペプチドタグは、分離、精製、視覚化、可溶化、または検出などの目的で、1以上の機能をタンパク質に授けるいずれかのペプチドタグまたはそのバリアントであり得る。ペプチドタグは、「アフィニティータグ」(タンパク質精製を容易化するため)、「可溶化タグ」(タンパク質の適切なフォールディングを補助するため)、「クロマトグラフィータグ」(タンパク質のクロマトグラフィー特性を変改するため)、「エピトープタグ」(高親和性抗体に結合するため)、および「蛍光タグ」(細胞のまたはin vitroのタンパク質の視覚化を容易化するため)を包含し得る。ペプチドタグの例は次のタグを包含するが、これらに限定されない:

【表３８－１】

名称	アミノ酸配列	配列番号
AVITAG™	GLNDIFEAQKIEWHE	配列番号245
C-タグ	EPEA	配列番号246
カルモジュリン-タグ	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	配列番号247
ポリグルタミン酸タグ	EEEEEE	配列番号248
E-タグ	GAPVPYPDPLEPR	配列番号249
FLAG-タグ	DYKDDDDK	配列番号250
HA-タグ	YPYDVPDYA	配列番号251
HIS-タグ	H(HIS_1) HH(HIS_2) HHH(HIS_3) HHHH(HIS_4) HHHHH(HIS_5) HHHHHH(HIS_6) HHHHHHH(HIS_7) HHHHHHHH(HIS_8) HHHHHHHHH(HIS_9) HHHHHHHHHH(HIS_{10}) HHHHHHHHHH…H…(HIS_N、ここで N=1～25)	配列番号252 配列番号253 配列番号254 配列番号255 配列番号256 配列番号257 配列番号258 配列番号259 配列番号260 配列番号261 配列番号262
MYC-タグ	EQKLISEEDL	配列番号263
NE-タグ	TKENPRSNQEESYDDNES	配列番号264
RHO1D4-タグ	TETSQVAPA	配列番号265
S-タグ	KETAAAKFERQHMDS	配列番号266
SBP-タグ	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRA RLEHHPQGQREP	配列番号267
SOFTAG-1	SLAELLNAGLGGS	配列番号268
SOFTAG-2	TQDPSRVG	配列番号269
SPOT-TAG	PDRVRAVSHWSS	配列番号270
STREP-タグ	WSHPQFEK	配列番号271
TC タグ	CCPGCC	配列番号272
TY タグ	EVHTNQDPLD	配列番号273
V5 タグ	GKPIPNPLLGLDST	配列番号274

【表３８－２】

VSV-タグ	YTDIEMNRLGK	配列番号275
XPRESS タグ	DLYDDDDK	配列番号276

【０７６５】

ペプチドタグは次のアフィニティータグ(タンパク質の分離および/または精製のため)でもまたあり得る(Kimple et al.,"Overview of Affinity Tags for Protein Purification,"Curr Protoc Protein Sci,2013,73:Unit-9.9の表9.9.1に記載されているとおり。これは参照によって本願に組み込まれる)。

【表３９】

名称	アミノ酸配列	
AU1 エピトープ	DTYRYI	配列番号 278
AU5 エピトープ	TDFYLK	配列番号 279
バクテリオファージ T7 エピトープ(T7-TAG)	MASMTGGQQMG	配列番号 280
ブルータンウイルスタグ(B-TAG)	QYPALT	配列番号 281
E2 エピトープ	SSTSSDFRDR	配列番号 282
ヒスチジン親和性タグ(HAT)	KDHLIHNVHKEFHAHAHNK	配列番号 283
HSV エピトープ	QPELAPED	配列番号 284
ポリアルギニン(ARG-TAG)	RRRRR	配列番号 285
ポリアスパラギン酸(ASP-TAG)	CCCC	配列番号 286
ポリフェニルアラニン(PHE-タグ)	FFFFFFFFFF	配列番号 287
S1-タグ	NANNPDWDF	配列番号 288
S-タグ	KETAAAKFERQHMDS	配列番号289
VSV-G	YTDIEMNRLGK	配列番号290

【０７６６】

具体的な態様では、ペプチドタグはHis^6タグ、FLAGタグ、V5タグ、GCN4タグ、HAタグ、Mycタグ、FIAsH/ReAsHタグ、ソルターゼ基質、パイクランプを包含し得る。

【０７６７】

種々の態様において、ペプチドタグは、タンパク質蛍光標識、免疫沈降、イムノブロッティング、免疫組織化学、タンパク質動員、誘導可能なタンパク質デグロン、およびゲノムワイドスクリーニングを包含する適用に用いられ得る。

【０７６８】

種々の他の態様において、ペプチドタグは、タンパク質自己スプライシング機能を組み入れるためにインテイン配列を包含し得る。本願において用いられる用語「インテイン」は、生命の全てのドメインからの生物に見出される自己プロセシングポリペプチドドメインを言う。インテイン(介在タンパク質)は、タンパク質スプライシングとして公知の固有の自己プロセシングイベントを実行する。これにおいては、それは2つのペプチド結合の切断によってそれ自体をより大きい前駆体ポリペプチドから切除、プロセスにおいて、新たなペプチド結合の形成によってフランキングするエクステイン(外部タンパク質)配列をライゲーションする。インテイン遺伝子は他のタンパク質コード遺伝子内にインフレームで埋め込まれて見出されるので、この再構成は翻訳後に(またはことによると共翻訳的に)生起する。さらにその上、インテインによって媒介されるタンパク質スプライシングは自発的である;それは外部の因子またはエネルギー源ではなくインテインドメインのフォールディングのみを要求する。このプロセスは、「分裂インテイン」によるトランスタンパク質スプライシングの天然のプロセスと対比してシスタンパク質スプライシングとしてもまた公知である。インテインは自己スプライシングRNAイントロンのタンパク質等価物であり(Perler et al.,Nucleic Acids Res.22:1125-1127(1994)を見よ)、これらは前駆体タンパク質からのそれら自体の切除を触媒し、エクステインとして公知のフランキングタンパク質配列の付随的融合を有する(Perler et al.,Curr.Opin.Chem.Biol.1:292-299(1997);Perler,F.B.Cell 92(1):1-4(1998);Xu et al.,EMBO J. 15(19):5146-5153(1996)において総説されている)。

【０７６９】

タンパク質スプライシングプロセスの機序は多大に詳細に研究されており(Chong,et al.,J.Biol.Chem.1996,271,22159-22168;Xu,M-Q & Perler,F.B.EMBO Journal,1996,15,5146-5153)、保存されたアミノ酸がインテインおよびエクステインスプライシング点に見出されている(Xu,et al.,EMBO Journal,1994,13 5517-522)。

【０７７０】
インテインは2つの別個に転写および翻訳される遺伝子によってコードされる2つのフラグメントとしてもまた存在し得る。これらの所謂分裂インテインは自己会合し(self-associate)、タンパク質-スプライシング活性をtransで触媒する。分裂インテインは、多様なシアノ細菌および古細菌において同定されている(Caspi et al,Mol Microbiol.50:1569-1577(2003);Choi J.et al,J Mol Biol.556:1093-1106(2006.);Dassa B.et al,Biochemistry.46:322-330(2007.);Liu X. and Yang J.,J Biol Chem.275:26315-26318(2003);Wu H.et al.Proc Natl Acad Sci USA.£5:9226-9231(1998.);およびZettler J.et al,FEBS Letters.553:909-914(2009))が、これまでbut have not been found in 真核生物からは見出されていない。近年、環境メタゲノムデータの生物情報学的(bioinformatic)分析から、新規ゲノム配置をもつ26の種々の遺伝子座が明らかにされた。各遺伝子座にて、保存された酵素コード領域は分裂インテインによって遮られており、独立型の(freestanding)エンドヌクレアーゼ遺伝子が、インテインサブドメインをコードする節(sections)間に挿入されている。それらのうち、5つの遺伝子座が完全にアセンブリされた:DNAヘリカーゼ(gp41-l、gp41-8);イノシン-5'-一リン酸デヒドロゲナーゼ(IMPDH-1);およびリボヌクレオチドレダクターゼ触媒サブユニット(NrdA-2およびNrdJ-1)である。このばらばらになった遺伝子編成は主にファージに存在するように見える(Dassa et al,Nucleic Acids Research.57:2560-2573(2009))。

【０７７１】
ある態様において、本明細書に記載のプライム編集因子は、分裂インテインタグを2つの異なるタンパク質上に挿入するために用いられ得、共発現されるときにそれらの細胞内ライゲーションを引き起こして融合タンパク質を形成する。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(例えばマイクロモル)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。

【０７７２】
分裂インテインNpu DnaEは、タンパク質トランススプライシング反応について報告された最も高い速度を有するとして特徴付けられた。加えて、Npu DnaEタンパク質スプライシング反応は、異なるエクステイン配列、6～37℃の温度、および最高で6Mの尿素の存在についてロバストかつ高収量と考慮される(Zettler J.et al,FEBS Letters.553:909-914(2009);Iwai I.et al,FEBS Letters 550:1853-1858(2006))。予想されたとおり、これらのインテインのNドメインにおけるCysl Ala変異が導入されたときには、当初のN→Sのアシルシフト、よってタンパク質スプライシングがブロックされた。残念ながら、C末端切断反応もまたほとんど完全に阻害された。N末端の切れやすいペプチド結合におけるアシルシフトに対するC末端スプライスジャンクションにおけるアスパラギン環化の依存性は、天然に分裂されたDnaEインテインアレルに普通の固有の特性であるように見える(Zettler J.et al.FEBS Letters.555:909-914(2009))。

【０７７３】
分裂インテイ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。分裂インテインは、夫々Nインテインおよびインテインという名称の2つのピースへと分裂された本質的に一続きのインテイン(例えばミニインテイン)である。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、一続きのインテイ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。分裂インテインは天然に見出され、実験室でもまた操作されている。本願において用いられる用語「分裂インテイン」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

かのインテインを言い、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イ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インまたはそのフラグメントが、本発明の方法への使用のための分裂インテインを導出するために用いられ得る。例えば、一側面において、分裂インテインは真核生物インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは細菌インテインに由来し得る。別の側面において、分裂インテインは古細菌インテインに由来し得る。好ましくは、そのように導出された分裂インテインは、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。

【０７７４】

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生出され得る。分裂の生出が、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ーが存在し得る。

【０７７５】

本明細書に記載のプライム編集因子は、ペプチドタグ(インテインを包含する)を目当てのタンパク質のC末端の端に組み込み得る。他の態様において、ペプチドタグ(インテインを包含する)は目当てのタンパク質のN末端の端に組み込まれ得る。ペプチドタグは目当てのタンパク質の内側にもまた組み込まれ得る。本明細書に記載のプライム編集因子によって生出されるもたらされる融合タンパク質は、次の構造を有し得る:

【０７７６】

[目当てのタンパク質]-[ペプチドタグ];

【０７７７】

[ペプチドタグ]-[目当てのタンパク質];または

【０７７８】

[目当てのタンパク質-N末端領域]-[ペプチドタグ]-[目当てのタンパク質-C末端領域]。

【０７７９】

ペプチドタグ付けへの使用のためのガイドRNAデザインの原理は、至る所でペプチドタグ付けに適用され得る。例えば、1つの態様では、ペプチドタグ付けのためのPEgRNA構造は次の構造を有し得る:5'-[スペーサー配列]-[gRNAコアまたは骨格]-[伸長アーム]-3'。伸長アームは、5'→3'方向に、相同アーム、編集鋳型(ペプチドタグをコードする配列を含む)、およびプライマー結合部位を含む。この構成は図3Dおよび図24に図示されている。

【０７８０】

別の態様では、ペプチドタグ付けのためのPEgRNA構造は、次の構造を有し得る:5'-[伸長アーム]-[スペーサー配列]-[gRNAコアまたは骨格]-3'。伸長アームは、5'→3'方向に、相同アーム、編集鋳型(ペプチドタグをコードする配列を含む)、およびプライマー結合部位を含む。この構成は図3Eに図示されている。

【０７８１】

プライム編集を用いるペプチドタグ付けの態様は図25および26に図示され、例4に記載されている。

【０７８２】

C．<u>RNAタグ付けのためのプライム編集の使用</u>

二重プライム編集は、RNAタグ付けによってRNA機能をコードするDNAの配列を操作、変改、および別様に改変するためにもまた用いられ得、このやり方で、RNAの構造および機能を間接的に改変するための手段を提供する。例えば、二重PEは、非コードRNAまたはmRNAをタグ付けまたは別様に操作するためのRNAレベルで機能的であるモチーフ(これ以降ではRNAモチーフ)を挿入するために用いられ得る。これらのモチーフは、

遺伝子発現を増大させるか、遺伝子発現を減少させるか、スプライシングを変改するか、転写後修飾を変化させるか、RNAの細胞下レベル位置付けに影響するか、RNAの単離または細胞内もしくは外の位置付けの決定を可能化するか(例えば、蛍光RNAアプタマー、例えばSpinach、Spinach2、Baby Spinach、またはBroccoliを用いる)、内生もしくは外因的なタンパク質もしくはRNA結合因子を動員するか、sgRNAを導入するか、あるいは自己切断またはRNAseどちらかによるRNAのプロセシングを誘導するための用をなし得る(さらなる詳細については図28Bおよび例6を見よ)。

【０７８３】

次のRNAタグまたはモチーフが、RNA輸送、発現レベル、スプライシング、および検出を包含するRNAの種々の特性に影響するための適当なPEgRNA(本願において提供されるガイダンスを用いてデザインされる)による二重プライム編集を(例えば図90の二重PE方法論とともに)用いて目当ての遺伝子上に挿入され得る。

【表４０－１】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
ポリオーマウイルスサルウイルス40(SV40)1型	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA(配列番号331)	タグ付けされた遺伝子の転写の終結;サイトゾルへのMRNAの輸送;増大したRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTCTATGGCCCTGACTGGAA(配列番号332)

【表４０－２】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
ポリオーマウイルスサルウイルス40(SV40)2型	CCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTC(配列番号333)	タグ付けされた遺伝子の転写の終結;サイトゾルへのMRNAの輸送;増大したRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCGAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTGGGCCATGGCTATGGCCCTGACTGGAA(配列番号334)
ポリオーマウイルスサルウイルス40(SV40)3型	TGATCATAATCAAGCCATATCACATCTGTAGAGGTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCTGC(配列番号335)	タグ付けされた遺伝子の転写の終結;サイトゾルへのMRNAの輸送;増大したRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCGCAGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAGATGTGATATGGCTTGATTATGATCACTATGGCCCTGACTGGAA(配列番号336)
ヒト成長ホルモン(hGH)	ACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGC	細胞質へのRNAの輸送;増強されたRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCAAGGACAGGGAAGGGAGCAGTGGTTCACGCCTGTAATCCCAGCAATTTGGGAGGCCAAGGTGGGTAGATCACCTGAGATTAGGAGTTGGAGACCAGCCTGGCCAATATGGTGAAACCCCGTCTCTACCAAAAAAACAAAAATTAGCTGAGCCTGGTCATGCATGCCTGGAATCCCAACAACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAA

【表４０－３】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
	TCACTGCAATCTCCGC CTCCTGGGTTCAAGCG ATTCTCCTGCCTCAGC CTCCCGAGTTGTTGGG ATTCCAGGCATGCATG ACCAGGCTCAGCTAATT TTTGTTTTTTTGGTAGA GACGGGGTTTCACCAT ATTGGCCAGGCTGGTC TCCAACTCCTAATCTCA GGTGATCTACCCACCTT GGCCTCCCAAATTGCT GGGATTACAGGCGTGA ACCACTGCTCCCTTCC CTGTCCTT（配列番号337）		CCCAGGAGGCGGAGATTGCAG TGAGCCAAGATTGTGCCACTGC ACTCCAGCTTGGTTCCCAATAG ACCCCGCAGGCCCTACAGGTT GTCTTCCCAACTTGCCCCTTGC TCCATACCACCCCCCTCCACC CCATAATATTATAGAAGGACAC CTAGTCAGACAAAATGATGCAA CTTAATTTTATTAGGACAAGGC TGGTGGGCACTGGAGTGGCAA CTTCCAGGGCCAGGAGAGGCA CTGGGGAGGGGTCACAGGGAT GCCACCCGTCTATGGCCCTGA CTGGAA（配列番号338）
ウシ成長ホルモン(BGH)	CGACTGTGCCTTCTAGT TGCCAGCCATCTGTTGT TTGCCCCTCCCCCGTG CCTTCCTTGACCCTGG AAGGTGCCACTCCCAC TGTCCTTTCCTAATAAA ATGAGGAAATTGCATCG CATTGTCTGAGTAGGTG TCATTCTATTCTGGGGG GTGGGGTGGGGCAGGA CAGCAAGGGGGAGGAT TGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGGATGC GGTGGGCTCTATGG（配列番号339）	細胞質へのRNAの輸送;増強されたRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCCCATAGAGCCCACCGCATC CCCAGCATGCCTGCTATTGTCT TCCCAATCCTCCCCCTTGCTGT CCTGCCCCACCCCACCCCCCA GAATAGAATGACACCTACTCAG ACAATGCGATGCAATTTCCTCA TTTTATTAGGAAAGGACAGTGG GAGTGGCACCTTCCAGGGTCA AGGAAGGCACGGGGGAGGGGC AAACAACAGATGGCTGGCAACT AGAAGGCACAGTCGCTATGGC CCTGACTGGAA（配列番号340）
ウサギベータ-グロビン(rbGlob)	TTCACTCCTCAGGTGCA GGCTGCCTATCAGAAG GTGGTGGCTGGTGTGG CCAATGCCCTGGCTCA CAAATACCACTGAGATC TTTTTCCCTCTGCCAAA AATTATGGGGACATCAT GAAGCCCCTTGAGCAT CTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCA TTGCAATAGTGTGTTGG AATTTTTTGTGTCTCTC ACTCGGAAGGACATAT GGGAGGGCAAATCATT	細胞質へのRNAの輸送;増強されたRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCGATCTCCATAAGAGAAGAGG GACAGCTATGACTGGGAGTAGT CAGGAGAGGAGGAAAAATCTG GCTAGTAAAACATGTAAGGAAA ATTTTAGGGATGTTAAAGAAAA AAATAACACAAAACAAAATATA AAAAAAATCTAACCTCAAGTCA AGGCTTTTCTATGGAATAAGGA ATGGACAGCAGGGGGCTGTTT

【表４０－４】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
	TAAAACATCAGAATGAG TATTTGGTTTAGAGTTT GGCAACATATGCCCAT ATGCTGGCTGCCATGA ACAAAGGTTGGCTATAA AGAGGTCATCAGTATAT GAAACAGCCCCCTGCT GTCCATTCCTTATTCCA TAGAAAAGCCTTGACTT GAGGTTAGATTTTTTTT ATATTTTGTTTTGTGTT ATTTTTTTCTTTAACAT CCCTAAAATTTTCCTTA CATGTTTTACTAGCCAG ATTTTTCCTCCTCTCCT GACTACTCCCAGTCATA GCTGTCCCTCTTCTCTT ATGGAGATC（配列番号341）		CATATACTGATGACCTCTTTAT AGCCAACCTTTGTTCATGGCAG CCAGCATATGGGCATATGTTGC CAAACTCTAAACCAAATACTCA TTCTGATGTTTTAAATGATTTG CCCTCCCATATGTCCTTCCGAG TGAGAGACACAAAAAATTCCAA CACACTATTGCAATGAAAATAA ATTTCCTTTATTAGCCAGAAGT CAGATGCTCAAGGGGCTTCATG ATGTCCCCATAATTTTTGGCAG AGGGAAAAAGATCTCAGTGGTA TTTGTGAGCCAGGGCATTGGCC ACACCAGCCACCACCTTCTGAT AGGCAGCCTGCACCTGAGGAG TGAACTATGGCCCTGACTGGAA（配列番号342）
チミジンキナーゼ(TK)	GGGGGAGGCTAACTGA AACACGGAAGGAGACA ATACCGGAAGGAACCC GCGCTATGACGGCAAT AAAAAGACAGAATAAAA CGCACGGGTGTTGGGT CGTTTGTTCATAAACGC GGGGTTCGGTCCCAGG GCTGGCACTCTGTCGA TACCCCACCGAGACCC CATTGGGGCCAATACG CCCGCGTTTCTTCCTTT TCCCCACCCCACCCCC CAAGTTCGGGTGAAGG CCCAGGGCTCGCAGCC AACGTCGGGGCGGCAG GCCCTGCCATAG（配列番号343）	細胞質へのRNAの輸送;増強されたRNA安定性およびコードされるタンパク質の発現	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCCTATGGCAGGGCCTGCCGC CCCGACGTTGGCTGCGAGCCC TGGGCCTTCACCCGAACTTGG GGGGTGGGGTGGGGAAAAGGA AGAAACGCGGGCGTATTGGCC CCAATGGGGTCTCGGTGGGGT ATCGACAGAGTGCCAGCCCTG GGACCGAACCCCGCGTTTATG AACAAACGACCCAACACCCGT GCGTTTTATTCTGTCTTTTTATT GCCGTCATAGCGCGGGTTCCTT CCGGTATTGTCTCCTTCCGTGT TTCAGTTAGCCTCCCCCCTATG GCCCTGACTGGAA（配列番号344）
MALAT1 ENE-mascRNA	TAGGGTCATGAAGGTTT TTCTTTTCCTGAGAAAA CAACACGTATTGTTTTC TCAGGTTTTGCTTTTTG GCCTTTTTCTAGCTTAA AAAAAAAAAAAGCAAAA GATGCTGGTGGTTGGC ACTCCTGGTTTCCAGG	核におけるRNAの保持、転写物終結、および安定化をもたらす	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCAGTCAAAGCAAAGACGCCG CAGGGATTTGAACCCCGTCCTG GAAACCAGGAGTGCCAACCAC

【表４０－５】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
	ACGGGGTTCAAATCCC TGCGGCGTCTTTGCTTT GACT（配列番号345）		CAGCATCTTTTGCTTTTTTTTTT TTTAAGCTAGAAAAAGGCCAAA AAGCAAAACCTGAGAAAACAAT ACGTGTTGTTTTCTCAGGAAAA GAAAAACCTTCATGACCCTACT ATGGCCCTGACTGGAA（配列番号346）
KSHV PAN ENE	TGTTTTGGCTGGGTTTT TCCTTGTTCGCACCGG ACACCTCCAGTGACCA GACGGCAAGGTTTTTAT CCCAGTGTATATTGGAA AAACATGTTATACTTTT GACAATTTAACGTGCCT AGAGCTCAAATTAAACT AATACCATAACGTAATG CAACTTACAACATAAAT AAAGGTCAATGTTTAAT CCATAAAAAAAAAAAAA AAAAAA（配列番号347）	核におけるRNAの保持、転写物終結、および安定化をもたらす	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAT GGATTAAACATTGACCTTTATT TATGTTGTAAGTTGCATTACGT TATGGTATTAGTTTAATTTGAG CTCTAGGCACGTTAAATTGTCA AAAGTATAACATGTTTTTCCAA TATACACTGGGATAAAAACCTT GCCGTCTGGTCACTGGAGGTG TCCGGTGCGAACAAGGAAAAA CCCAGCCAAAACACTATGGCC CTGACTGGAA（配列番号348）
短い保存されていないRNAリンカーを有する3つの逐次的なKSHV PAN ENE	TGTTTTGGCTGGGTTTT TCCTTGTTCGCACCGG ACACCTCCAGTGACCA GACGGCAAGGTTTTTAT CCCAGTGTATATTGGAA AAACATGTTATACTTTT GACAATTTAACGTGCCT AGAGCTCAAATTAAACT AATACCATAACGTAATG CAACTTACAACATAAAT AAAGGTCAATGTTTAAT CCATAAAAAAAAAAAAA AAAAAAACACACTGTTT TGGCTGGGTTTTTCCTT GTTCGCACCGGACACC TCCAGTGACCAGACGG CAAGGTTTTTATCCCAG TGTATATTGGAAAAACA TGTTATACTTTTGACAA TTTAACGTGCCTAGAGC TCAAATTAAACTAATAC CATAACGTAATGCAACT TACAACATAAATAAAGG TCAATGTTTAATCCATA	核におけるRNAの保持、転写物終結、および安定化をもたらす。単一のPAN ENEよりも多大であることが予測される	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAT GGATTAAACATTGACCTTTATT TATGTTGTAAGTTGCATTACGT TATGGTATTAGTTTAATTTGAG CTCTAGGCACGTTAAATTGTCA AAAGTATAACATGTTTTTCCAA TATACACTGGGATAAAAACCTT GCCGTCTGGTCACTGGAGGTG TCCGGTGCGAACAAGGAAAAA CCCAGCCAAAACAGAGAGATTT TTTTTTTTTTTTTTTTATGGATT AAACATTGACCTTTATTTATGT TGTAAGTTGCATTACGTTATGG TATTAGTTTAATTTGAGCTCTA GGCACGTTAAATTGTCAAAAGT ATAACATGTTTTTCCAATATAC ACTGGGATAAAAACCTTGCCGT CTGGTCACTGGAGGTGTCCGG TGCGAACAAGGAAAAACCCAG

【表４０－６】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
	AAAAAAAAAAAAAAAAA ATCTCTCTGTTTTGGCT GGGTTTTTCCTTGTTCG CACCGGACACCTCCAG TGACCAGACGGCAAGG TTTTTATCCCAGTGTAT ATTGGAAAAACATGTTA TACTTTTGACAATTTAA CGTGCCTAGAGCTCAA ATTAAACTAATACCATA ACGTAATGCAACTTACA ACATAAATAAAGGTCAA TGTTTAATCCATAAAAA AAAAAAAAAAAAAA（配列番号349）		CCAAAACAGTGTGTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTATGGATTAAACA TTGACCTTTATTTATGTTGTAA GTTGCATTACGTTATGGTATTA GTTTAATTTGAGCTCTAGGCAC GTTAAATTGTCAAAAGTATAAC ATGTTTTTCCAATATACACTGG GATAAAAACCTTGCCGTCTGGT CACTGGAGGTGTCCGGTGCGA ACAAGGAAAAACCCAGCCAAA ACACTATGGCCCTGACTGGAA（配列番号350）
Smbox/U1 snRNAボックス	CAGCAAGTTCAGAGAA ATCTGAACTTGCTGGAT TTTTGGAGCAGGGAGA TGGAATAGGAGCTTGCT CCGTCCACTCCACGCA TCGACCTGGTATTGCA GTACCTCCAGGAACGG TGCACCCACTTTCTGGA GTTTCAAAAGTAGACTG TACGCTAAGGGTCATAT CTTTTTTTGTTTGGTTT GTGTCTTGGTTGGCGTC TTAAA（配列番号351）	核におけるRNAの保持および転写物終結をもたらす	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCTTTAAGACGCCAACCAAGAC ACAAACCAAACAAAAAAAGATA TGACCCTTAGCGTACAGTCTAC TTTTGAAACTCCAGAAAGTGGG TGCACCGTTCCTGGAGGTACTG CAATACCAGGTCGATGCGTGG AGTGGACGGAGCAAGCTCCTA TTCCATCTCCCTGCTCCAAAAA TCCAGCAAGTTCAGATTTCTCT GAACTTGCTGCTATGGCCCTGA CTGGAA（配列番号352）
U1 snRNA 3’ボックス	GTTTCAAAAGTAGACTG TACGCTAAGGGTCATAT CTTTTTTTGTTTGGTTT GTGTCTTGGTTGGCGTC TTAAA（配列番号353）	核におけるRNAの保持および転写物終結をもたらす	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCTTTAAGACGCCAACCAAGAC ACAAACCAAACAAAAAAAGATA TGACCCTTAGCGTACAGTCTAC TTTTGAAACCTATGGCCCTGAC TGGAA （配列番号354）
tRNA-リジン	GCCCGGCTAGCTCAGT CGGTAGAGCATGAGAC TCTTAATCTCAGGGtCG TGGGTTCGAGCCCCAC GTTGGGCG（配列番号35	ミトコンドリアへのRNAの輸送を可能化することが報告されている	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA

【表４０－７】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
	5)		TCCGCCCAACGTGGGGCTCGA ACCCACGaCCCTGAGATTAAGA GTCTCATGCTCTACCGACTGAG CTAGCCGGGCCTATGGCCCTG ACTGGAA(配列番号356)
Broccoliアプタマー	GAGACGGTCGGGTCCA GATATTCGTATCTGTCG AGTAGAGTGTGGGCTC(配列番号357)	視覚化(蛍光)	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCGAGCCCACACTCTACTCGAC AGATACGAATATCTGGACCCGA CCGTCTCCTATGGCCCTGACTG GAA (配列番号358)
Spinachアプタマー	Gacgcaactgaatgaaatggtgaa ggacgggtccaggtgtggctgcttc ggcagtgcagcttgttgagtagagtg tgagctccgtaactagtcgcgtc(配列番号359)	視覚化(蛍光)	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCGACGCGACTAGTTACGGAG CTCACACTCTACTCAACAAGCT GCACTGCCGAAGCAGCCACAC CTGGACCCGTCCTTCACCATTT CATTCAGTTGCGTCCTATGGCC CTGACTGGAA(配列番号360)
Spinach2アプタマー	gatgtaactgaatgaaatggtgaag gacgggtccagtaggctgcttcggc agcctacttgttgagtagagtgtgag ctccgtaactagttacatc(配列番号361)	視覚化(蛍光)	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCGATGTAACTAGTTACGGAGC TCACACTCTACTCAACAAGTAG GCTGCCGAAGCAGCCTACTGG ACCCGTCCTTCACCATTTCATT CAGTTACATCCTATGGCCCTGA CTGGAA(配列番号362)
Mangoアプタマー	ggcacgtacgaagggacggtgcgg agaggagagtacgtgc(配列番号363)	視覚化(蛍光)	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGT TTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT CAACTTGAAAAAGTGGGACCGA GTCGGTCCACCTGAACCGTATA TCGCACGTACTCTCCTCTCCGC ACCGTCCCTTCGTACGTGCCCT ATGGCCCTGACTGGAA(配列番号364)
HDVリボザイ	GGCCGGCATGGTCCCA	3'端RNAプロセシング	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGT

【表４０－８】

RNAモチーフ	RNAモチーフの配列	機能/効果	例示のHEXA遺伝子上へのRNAモチーフのプライム編集挿入のための例示のPEgRNA*
ム	GCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC(配列番号365)		TTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCGTCCCATTCGCCATGCCGAAGCATGTTGCCCAGCCGGCGCCAGCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCCTATGGCCCTGACTGGAA(配列番号366)
N^6-メチルアデノシンマーカー(m^6A)	GGACTCTAGGACTGGACTTTGGACT(配列番号367)	メチル化の標的(下線付きAはメチル化される)。m6Aメチル化は増強されたRNA安定性および発現をもたらし得るが、まだ完全には理解されていない	ATCCTTCCAGTCAGGGCCATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATCAGTCCAAAGTCCAGTCCTAGAGTCCCTATGGCCCTGACTGGAA(配列番号368)

*各PEgRNAは5'から3'の方向で示され、次のとおり、フォントタイプによって指定される図3Fの次の構造要素を有する:5'-スペーサー配列(ノーマルフォント)-gRNAコア(下線付き配列)-相同アーム(イタリック)-RT鋳型(太字フォント)-プライマー結合部位(イタリック)-3'。

【０７８４】

上の表のPEgRNAは、上のモチーフの例をHEXA遺伝子(テイ・サックス病において欠陥がある)に部位特異的に挿入するためにデザインされている(例えば、GenBank No.KR710351.1(配列番号369)。しかしながら、これは例解の目的のためのみである。RNAタグ付けへのプライム編集の使用はHEXA遺伝子に限定されず、実にいずれかの遺伝子であり得る。

HEXA mRNAは以下のヌクレオチド配列を有する:

GTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAA
AAAGTTGGCATGACAAGTTCCAGGCTTTGGTTTTCGCTGCTGCTGGCGGCAGCGTT
CGCAGGACGGGCGACGGCCCTCTGGCCCTGGCCTCAGAACTTCCAAACCTCCGACC
AGCGCTACGTCCTTTACCCGAACAACTTTCAATTCCAGTACGATGTCAGCTCGGCC
GCGCAGCCCGGCTGCTCAGTCCTCGACGAGGCCTTCCAGCGCTATCGTGACCTGCT
TTTCGGTTCCGGGTCTTGGCCCCGTCCTTACCTCACAGGGAAACGGCATACACTGG
AGAAGAATGTGTTGGTTGTCTCTGTAGTCACACCTGGATGTAACCAGCTTCCTACT
TTGGAGTCAGTGGAGAATTATACCCTGACCATAAATGATGACCAGTGTTTACTCCT
CTCTGAGACTGTCTGGGGAGCTCTCCGAGGTCTGGAGACTTTTAGCCAGCTTGTTT
GGAAATCTGCTGAGGGCACATTCTTTATCAACAAGACTGAGATTGAGGACTTTCCC
CGCTTTCCTCACCGGGGCTTGCTGTTGGATACATCTCGCCATTACCTGCCACTCTCT
AGCATCCTGGACACTCTGGATGTCATGGCGTACAATAAATTGAACGTGTTCCACTG
GCATCTGGTAGATGATCCTTCCTTCCCATATGAGAGCTTCACTTTTCCAGAGCTCAT
GAGAAAGGGGTCCTACAACCCTGTCACCCACATCTACACAGCACAGGATGTGAAGG
AGGTCATTGAATACGCACGGCTCCGGGGTATCCGTGTGCTTGCAGAGTTTGACACT
CCTGGCCACACTTTGTCCTGGGGACCAGGTATCCCTGGATTACTGACTCCTTGCTA
CCCTGGGTCTGAGCCCTCTGGCACCTTTGGACCAGTGAATCCCAGTCTCAATAATA
CCTATGAGTTCATGAGCACATTCTTCTTAGAAGTCAGCTCTGTCTTCCCAGATTTTT
ATCTTCATCTTGGAGGAGATGAGGTTGATTTCACCTGCTGGAAGTCCAACCCAGAG
ATCCAGGACTTTATGAGGAAGAAAGGCTTCGGTGAGGACTTCAAGCAGCTGGAGTC
CTTCTACATCCAGACGCTGCTGGACATCGTCTCTTCTTATGGCAAGGGCTATGTGG

TGTGGCAGGAGGTGTTTGATAATAAAGTAAAGATTCAGCCAGACACAATCATACAG
GTGTGGCGAGAGGATATTCCAGTGAACTATATGAAGGAGCTGGAACTGGTCACCAA
GGCCGGCTTCCGGGCCCTTCTCTCTGCCCCCTGGTACCTGAACCGTATATCCTATGG
CCCTGACTGGAAGGATTTCTACGTAGTGGAACCCCTGGCATTTGAAGGTACCCCTG
AGCAGAAGGCTCTGGTGATTGGTGGAGAGGCTTGTATGTGGGGAGAATATGTGGAC
AACACAAACCTGGTCCCCAGGCTCTGGCCCAGAGCAGGGGCTGTTGCCGAAAGGCT
GTGGAGCAACAAGTTGACATCTGACCTGACATTTGCCTATGAACGTTTGTCACACT
TCCGCTGTGAGTTGCTGAGGCGAGGTGTCCAGGCCCAACCCCTCAATGTAGGCTTC
TGTGAGCAGGAG TTTGAACAGACCTGCCCAACTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTAT
AAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAAC(配列番号369)。

【0785】

対応するHEXAタンパク質は以下のアミノ酸配列を有する:

MTSSRLWFSLLLAAAFAGRATALWPWPQNFQTSDQRYVLYPNNFQFQYDVSSAAQ
PGCSVLDEAFQRYRDLLFGSGSWPRPYLTGKRHTLEKNVLVVSVVTPGCNQLPTLES
VENYTLTINDDQCLLLSETVWGALRGLETFSQLVWKSAEGTFFINKTEIEDFPRFPH
RGLLLDTSRHYLPLSSILDTLDVMAYNKLNVFHWHLVDDPSFPYESFTFPELMRKGS
YNPVTHIYTAQDVKEVIEYARLRGIRVLAEFDTPGHTLSWGPGIPGLLTPCYPGSEPS
GTFGPVNPSLNNTYEFMSTFFLEVSSVFPDFYLHLGGDEVDFTCWKSNPEIQDFMRK
KGFGEDFKQLESFYIQTLLDIVSSYGKGYVVWQEVFDNKVKIQPDTIIQVWREDIPV
NYMKELELVTKAGFRALLSAPWYLNRISYGPDWKDFYVVEPLAFEGTPEQKALVIGG
EACMWGEYVDNTNLVPRLWPRAGAVAERLWSNKLTSDLTFAYERLSHFRCELLRRG
VQAQPLNVGFCEQEFEQT(配列番号370)。

【0786】

注意すべきことに、もたらされるRNAモチーフはHEXA遺伝子の翻訳領域内に包含され、タンパク質コード遺伝子の機能を遮断するであろう。挿入されるポリアデニル化モチーフは未成熟転写物終結をもたらすであろう。この部位は、転写される、それゆえにRNA産物を生ずるであろうゲノム部位内における上の表の列記されるRNAモチーフの挿入をもたらし得る可能性あるPEgRNAを単に例解している。

【0787】

RNAタグ付けのためのPEへの使用のためのPEgRNAは、U6プロモーター(このケースでは、Gで始まらないプロトスペーサーを包含するガイドでは、単一のグアノシンがPEgRNAの5'端に追加され、6～7つのチミンが3'端に追加されるであろう)またはpolIIプロモーター、例えばpCMV(このケースでは、自己切断エレメントまたはCsy4モチーフによってRNAの5'端からこのプロモーターの本来的に転写される配列を除去することが必要であり得、終結モチーフが、核からのRNAの搬出をもたらさないRNAの3'端に追加されることを必要とするであろう。例えば上に列記されている3'ボックスモチーフである。それはアニーリング領域の3'であろうから、このモチーフはPEの結果としてゲノム上に挿入されないであろうということに注意せよ)から発現され得る。コアPEgRNA骨格は下線付きであり、相同性およびアニーリング領域はイタリックであり、挿入配列は太字である。下で記載されるとおり、挿入される配列は上の例の逆相補体であり、よって、これらのPEgRNAはコード鎖へと標的化されることを必要とするであろうということに注意せよ。

【0788】

また、HDV以外の自己切断リボザイムは、いくつかの態様では、所与の標的部位に合わせて仕立てられることを必要とするということに注意せよ;つまり、HDVはコードされる転写物をそれ自体の直ちに5'において切断するが、全ての他の自己切断リボザイムのカットされる部位はリボザイムそれ自体の内にある。よって、最初および最後の大体5～10ヌクレオチド(そしていくつかの場合には、可能性としては10よりも多く)は実際にはコードされる配列の一部であろう。例として、ハンマーヘッド自己切断リボザイムを用いて、Nがいずれかのヌクレオチドである配列5'NNNNNTCATCCTGATAAACTGCAAA3'

(配列番号３７１)を５つのＮの後で切断するためには、次の配列が挿入されるであろう。ここで、下線付き配列は完璧ではないＲＮＡ対形成エレメントを形成する。

【０７８９】

5'NNNNNCAGTTTGTACGGATGACTGATGAGTCCCAAATAGGACGAAACGCGCTTCGGTGCGTCTCATCCTGATAAACTGCAAA-3'(配列番号３７２)。

【０７９０】

この対形成エレメントの長さおよび性質の観点からは有意なフレキシビリティーがあり、これは元の提出物に列記される非ＨＤＶ自己切断リボザイムのいずれかについて真であろう。上に列記されている構築物と同じプロトスペーサーを有するＰＥｇＲＮＡを用いてｈｅｘＡ ｍＲＮＡを切断するハンマーヘッドリボザイムを組み入れるためには、次のＰＥｇＲＮＡ配列が用いられ得る(標識は上と同じ):

【０７９１】

【化４－１】

5′ACCTGAACCGTATATCGACGCACCGAAGCGCGTTTCGTCCTATTTGGGAC
TCATCAGGATATACGGTTCAGGTGATATACGGTTCAGGTGACGCACCGAAGCGCGT
TTCGTCCTATTTGGGACTCATCAGACCTGAACCGTATATCATCCTTCCAGTCAGGGC
CATGTTTGAGAGCTAGAAATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG
AAAAAGTGGGACCGAGTCGGTCCACCTGAACCGTATATC**GACGCACCGAAGCGC**

【化４－２】

GTTTCGTCCTATTTGGGACTCATCAGGATATACGGTTCAGGTCTATGGCCCTGA
CTGGAA-3′

(ここで、コアＰＥｇＲＮＡ骨格に下線を付し、相同領域およびアニーリング領域は斜字体に、挿入配列は太字にしている)(配列番号３７３)。

【０７９２】

ＲＮＡモチーフの挿入のために他のＰＥｇＲＮＡをデザインすることは、本明細書に記載の一般的な原理を踏襲する。しかしながら、ＲＮＡモチーフの多くは可能性として高度に構造化されているということが注意される。これはそれらが逆転写およびゲノム上に挿入されることを困難にし得る。いくつかのＲＮＡ配列、例えば単純なヘアピンでは、ＲＮＡ配列それ自体およびその相補体両方が構造化されているが、しかしながら、それは上に記されている配列について真であることは非蓋然的である。よって、これらのモチーフを挿入するときには、最も蓋然的には、ＰＥｇＲＮＡがこれらの配列の逆相補体をコードし、ゲノム上への実際にモチーフをコードするＤＮＡ配列の挿入をもたらすことが最善であろう。類似に、ＰＥｇＲＮＡ鋳型領域への自己切断リボザイムの包含はプロセシングおよび非効率的な活性をもたらすであろうが、その逆相補体の包含はもたらさないであろう。それゆえに、これらのＰＥｇＲＮＡは蓋然的にはコード鎖を標的化しなければならないであろうが、他の型の挿入(例えば治療学的な修正)をコードするＰＥｇＲＮＡは理論的にはどちらの鎖も標的化する能力があるであろう。

【０７９３】

また、挿入されるモチーフの多くでは、もたらされるＰＥｇＲＮＡはＵ６プロモーターから転写される能力がなくあり得、他のプロモーター、例えばｐＣＭＶの使用を要するということに注意せよ。類似に、より長いＰＥｇＲＮＡもまたより安定ではなくあり得る。m^6Aマーカーなどのより短いモチーフはこの課題を有さないであろう。

【０７９４】

Ｄ．免疫エピトープの挿入のためのプライム編集の使用

二重プライム編集(例えば図９０に示される態様など)は、公知の免疫原性エピトープを

内生または外生のゲノムDNA上に挿入するための手段としてもまた用いられ得、治療学的またはバイオテクノロジー的適用のための対応するタンパク質の改変をもたらす(図31および32を見よ)。古典的プライム編集または二重プライム編集の本発明に先行しては、かかる挿入は、非効率的にかつDSBからの高いインデル形成率によってのみ達成され得た。プライム編集は挿入編集からの高いインデル形成の問題を解決しながら、一般的にHDRよりも高い効率をオファーする。このより低いインデル形成率は、特に免疫原性エピトープを挿入するという記載されている適用において、標的化されたDNA挿入のための方法としてのHDRと比べたプライム編集の主要な利点を提示する。エピトープの長さは少数塩基～数百塩基の範囲である。プライム編集因子はかかる標的化された挿入を哺乳類細胞において達成するための効率的なアプローチである。

【０７９５】

本発明の鍵の概念は、それらのタンパク質産物および/または発現細胞型の下方制御および/または破壊のために、内生または外生のゲノムDNA上に、先に記載された免疫原性エピトープを含有するヌクレオチド配列を挿入するための二重プライム編集因子の使用である。標的遺伝子のコードされるタンパク質と挿入される免疫原性のエピトープの対応するタンパク質翻訳との融合タンパク質を生ずる様式で、免疫原性のエピトープ挿入のためのヌクレオチド配列が、遺伝子へと標的化されるであろう。患者の免疫系は、例えば破傷風またジフテリアまたは麻疹に対するルーチンの予防接種からの先行する標準免疫化の結果として、これらのエピトープを認識するように先に訓練されているであろう。融合されるエピトープの免疫原性の性質の結果として、患者の免疫系は、プライム編集されたタンパク質(ただの挿入されるエピトープではない)と可能性としてはそれが発現された細胞とを認識および不能化することが予想されるであろう。

【０７９６】

CRISPR/Casシステムを用いる精密なゲノム標的化テクノロジーが、最近では、標的ゲノム遺伝子座上への操作されたDNA配列の挿入を包含する広い範囲の適用において調査されている。先には、相同組み換え修復(HDR)がこの適用について用いられ、ssDNAドナー鋳型と二本鎖DNA切断(DSB)の手段による修復開始とを要求した。この戦略は、細胞になされるべき可能な変化の最も幅広い範囲をオファーし、大きいDNA配列を哺乳類細胞に挿入するために利用可能な唯一の方法である。しかしながら、HDRは、そのDSBを開始することから派生する望まれない細胞副作用、例えば高いレベルのインデル形成、DNA転座、大きい欠失、およびP53活性化によって邪魔される。これらの欠点に加えて、HDRは多くの細胞型における低い効率によって限定される(T細胞はこの観察の注意すべき例外である)。これらの欠点を克服するための最近の作業は、ヒトRad51変異体をCas9 D10Aニッカーゼに融合することを包含し(RDN)、DSBフリーHDRシステムをもたらす。これは、改善されたHDR産物:インデル比およびより低いオフターゲット編集を特色とするが、細胞型依存性および控えめなのみのHDR編集効率によってなお邪魔される。

【０７９７】

PEgRNAとカップリングされた逆転写酵素へのCas9の最近開発された融合体(「プライム編集因子」)は、存在するゲノム編集法と比べていくつもの利点をオファーする新規のゲノム編集テクノロジーを表し、部位特異的な様式で、いずれかの1ヌクレオチド置換を組み入れおよびヌクレオチドのいずれかの短いストレッチ(最高で少なくとも何ダースもの塩基)を挿入または欠失する能力を包含する。注意すべきことに、PE編集は一般的には低い意図されないインデル率によって達成される。そのため、PEは、先には不可能または非実用的であった標的化された挿入に基づく編集適用を可能化する。

【０７９８】

この具体的な側面は、公知の免疫原性エピトープを内生または外生のゲノムDNA上に挿入するための手段としてプライム編集を用いるための方法を記載し、治療学的またはバイオテクノロジー的適用のための対応するタンパク質の改変をもたらす(図31および32を見よ)。プライム編集の本発明に先行しては、かかる挿入は、非効率的にかつDSBから

の高いインデル形成率によってのみ達成され得た。プライム編集は挿入編集からの高いインデル形成の問題を解決しながら、一般的にHDRよりも高い効率をオファーする。このより低いインデル形成率は、特に免疫原性エピトープを挿入するという記載されている適用において、標的化されたDNA挿入のための方法としてのHDRと比べたプライム編集の主要な利点を提示する。エピトープの長さは少数塩基～数百塩基の範囲である。プライム編集因子はかかる標的化された挿入を哺乳類細胞において達成するための効率的なかつ最もクリーンなアプローチである。

【０７９９】

この側面の鍵の概念は、それらのタンパク質産物および/または発現細胞型の下方制御および/または破壊のために、先に記載された免疫原性エピトープを含有するヌクレオチド配列を内生または外生のゲノムDNA上に挿入するためのプライム編集因子の使用である。標的遺伝子のコードされるタンパク質と挿入される免疫原性のエピトープの対応するタンパク質翻訳との融合タンパク質を生ずる様式で、免疫原性のエピトープ挿入のためのヌクレオチド配列は、遺伝子へと標的化されるであろう。患者の免疫系は、例えば破傷風またジフテリアまたは麻疹に対するルーチンの予防接種からの先行する標準免疫化の結果として、これらのエピトープを認識するように先に訓練されているであろう。融合されるエピトープの免疫原性の性質の結果として、患者の免疫系は、プライム編集されたタンパク質(ただの挿入されるエピトープではない)と可能性としてはそれが発現された細胞とを認識および不能化することが予想されるであろう。

【０８００】

標的遺伝子への融合体は、挿入されたエピトープタンパク質翻訳が免疫系認識のために暴露されるということを保証するために必要とされるとおり操作されるであろう。これは、免疫原性エピトープがタンパク質構造の表面に暴露された領域にコードされるようにして、標的遺伝子への免疫原性エピトープのC末端融合体、標的遺伝子への免疫原性エピトープのN末端融合体、または遺伝子上へのヌクレオチドの挿入を生むタンパク質翻訳をもたらす標的化されたヌクレオチド挿入を包含し得る。

【０８０１】

標的遺伝子の免疫系認識、細胞輸送、タンパク質機能、またはタンパク質フォールディングを容易化するために、標的遺伝子配列と挿入される免疫原性エピトープヌクレオチド配列との間に挿入されるヌクレオチドとしてコードされるタンパク質リンカーが、本発明の一部として操作されることを必要とし得る。これらの挿入されるヌクレオチドによってコードされるタンパク質リンカーは、可変の長さおよび配列のXTENリンカーまたは可変の長さおよび配列のグリシン-セリンリンカーを包含し得る(が、これらに限定されない)。これらの操作されたリンカーは、タンパク質融合を首尾良く容易化するために先に用いられている。例示のリンカーは、本明細書に記載のもののいずれかを包含し得、アミノ酸配列(GGGGS)n(配列番号165)、(G)n(配列番号166)、(EAAAK)n(配列番号167)、(GGS)n(配列番号168)、(SGGS)n(配列番号169)、(XP)n(配列番号170)、またはそれらのいずれかの組み合わせを包含し、nは独立して1および30の間の整数であり、Xはいずれかのアミノ酸である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列(GGS)n(配列番号176)を含み、nは1、3、または7である。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGSETPGTSESATPES(配列番号171)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGS(配列番号172)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGSGGSGGS(配列番号173)を含む。いくつかの態様では、リンカーはアミノ酸配列SGGS(配列番号174)を含む。

【０８０２】

この側面の際立った特色は、さもなければ非免疫原性のタンパク質に対する免疫応答を誘導するための手段として、特定のアミノ酸配列に対する先に獲得された免疫応答を用いる能力を包含する。別の際立った特色は、副産物編集としての欲されないインデルの高いレベルを誘導せずかつその挿入が効率的である標的様式で、これらの免疫原性のエピトープのヌクレオチド配列を挿入する能力である。PEのこの特定の適用は、細胞型特異的な

送達方法(例えばAAV血清型)を組み合わせて、それに対する免疫応答を誘発することが目当てである細胞型にエピトープを挿入する能力を有する。

【０８０３】

免疫原性のエピトープを病原性の遺伝子上に挿入する手段としてのプライム編集は、広い種々の疾患(免疫腫瘍学戦略のがんに限定されない)と戦うように患者の免疫系をプログラムするために用いられ得る。このテクノロジーの直ちに該当する使用は、がんの治療学としてであろう。なぜなら、それは、HER2のような該当するがん遺伝子またはEGFRのような増殖因子に対する免疫応答を引き起こすことによって、腫瘍の免疫エスケープ機序を阻み得るからである。かかるアプローチはT細胞操作に類似に見え得るが、このアプローチの1つの新規の進歩は、操作されたT細胞を生成し患者に導入することを必要とすることなしに、それが多くの細胞型におよびがん以外の疾患に利用され得るということである。

【０８０４】

PEを用いて、ほとんどの者がすでに予防接種されている免疫原性エピトープ(破傷風、百日咳、ジフテリア、麻疹、ムンプス、風疹など)を疾患を駆動する外生のまたは内生遺伝子上に挿入し、そのため、患者の免疫系はそのタンパク質を不能化することを学習する。

【０８０５】

前述の戦略からの可能性ある治療学的な利益を有しそうな疾患は、毒性のタンパク質の凝集によって引き起こされるもの、例えば致死性家族性不眠症を包含する。利し得る他の疾患は、さもなければ非毒性の内生タンパク質の病原性の過剰発現によって引き起こされるもの、および外生の病原体によって引き起こされるものを包含する。

【０８０６】

一次的な治療学的適応は、上で言及されているもの、例えばがん、プリオン、および他の神経変性疾患の治療学、感染性疾患、ならびに予防的な医療を包含する。二次的な治療学的適応は、遅発性の遺伝子疾患を有する患者の予防的ケアを包含し得る。特に侵襲性のがんのようないくつかの疾患では、または薬物治療が疾患が完全に治癒するまで疾患症状を緩和することを助けるケースでは、現行の標準治療の医療がプライム編集と併せて用いられ得るということが予想される。下は、本明細書に開示のプライム編集因子によって遺伝子上に挿入され得る免疫エピトープの例である:

【表４１－１】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
1	破傷風トキソ	QYIKANSKFIGITEL	CATGATATAAAAGCAAATTCTAAATTTATAG

【表４１－２】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
	イド	(配列番号396)	GTATAACTGAACTA(配列番号397)
2	ジフテリア毒素変異体CRM197	GADDVVDSSKSFVM ENFSSYHGTKPGYVD SIQKGIQKPKSGTQG NYDDDWKEFYSTDN KYDAAGYSVDNENP LSGKAGGVVKVTYP GLTKVLALKVDNAE TIKKELGLSLTEPLM EQVGTEEFIKRFGDG ASRVVLSLPFAEGSSS VEYINNWEQAKALSV ELEINFETRGKRGQD AMYEYMAQACAGNR VRRSVGSSLSCINLD WDVIRDKTKTKIESL KEHGPIKNKMSESPN KTVSEEKAKQYLEEF HQTALEHPELSELKT VTGTNPVFAGANYA AWAVNVAQVIDSET ADNLEKTTAALSILP GIGSVMGIADGAVHH NTEEIVAQSIALSSLM VAQAIPLVGELVDIG FAAYNFVESIINLFQV VHNSYNRPAYSPGHK TQPFLHDGYAVSWN TVEDSIIRTGFQGESG HDIKITAENTPLPIAG VLLPTIPGKLDVNKS KTHISVNGRKIRMRC RAIDGDVTFCRPKSP VYVGNGVHANLHVA FHRSSSEKIHSNEISSD SIGVLGYQKTVDHTK VNSKLSLFFEIKS(配列番号398)	GGCGCCGACGACGTGGTGGACAGCAGCAA GAGCTTCGTGATGGAGAACTTCAGCAGCTA CCACGGCACCAAGCCCGGCTACGTGGACA GCATCCAGAAGGGCATCCAGAAGCCCAAG AGCGGCACCCAGGGCAACTACGACGACGA CTGGAAGGAGTTCTACAGCACCGACAACAA GTACGACGCCGCCGGCTACAGCGTGGACA ACGAGAACCCCCTGAGCGGCAAGGCCGGC GGCGTGGTGAAGGTGACCTACCCCGGCCT GACCAAGGTGCTGGCCCTGAAGGTGGACAA CGCCGAGACCATCAAGAAGGAGCTGGGCC TGAGCCTGACCGAGCCCCTGATGGAGCAG GTGGGCACCGAGGAGTTCATCAAGAGGTTC GGCGACGGCGCCAGCAGGGTGGTGCTGAG CCTGCCCTTCGCCGAGGGCAGCAGCAGCG TGGAGTACATCAACAACTGGGAGCAGGCCA AGGCCCTGAGCGTGGAGCTGGAGATCAACT TCGAGACCAGGGGCAAGAGGGGCCAGGAC GCCATGTACGAGTACATGGCCCAGGCCTGC GCCGGCAACAGGGTGAGGAGGAGCGTGGG CAGCAGCCTGAGCTGCATCAACCTGGACTG GGACGTGATCAGGGACAAGACCAAGACCAA GATCGAGAGCCTGAAGGAGCACGGCCCCA TCAAGAACAAGATGAGCGAGAGCCCCAACA AGACCGTGAGCGAGGAGAAGGCCAAGCAG TACCTGGAGGAGTTCCACCAGACCGCCCTG GAGCACCCCGAGCTGAGCGAGCTGAAGAC CGTGACCGGCACCAACCCCGTGTTCGCCG GCGCCAACTACGCCGCCTGGGCCGTGAAC GTGGCCCAGGTGATCGACAGCGAGACCGC CGACAACCTGGAGAAGACCACCGCCGCCC TGAGCATCCTGCCCGGCATCGGCAGCGTG ATGGGCATCGCCGACGGCGCCGTGCACCA CAACACCGAGGAGATCGTGGCCCAGAGCA TCGCCCTGAGCAGCCTGATGGTGGCCCAG GCCATCCCCCTGGTGGGCGAGCTGGTGGA CATCGGCTTCGCCGCCTACAACTTCGTGGA GAGCATCATCAACCTGTTCCAGGTGGTGCA CAACAGCTACAACAGGCCCGCCTACAGCC CCGGCCACAAGACCCAGCCCTTCCTGCAC GACGGCTACGCCGTGAGCTGGAACACCGT GGAGGACAGCATCATCAGGACCGGCTTCCA GGGCGAGAGCGGCCACGACATCAAGATCA

【表４１－３】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
			CCGCCGAGAACACCCCCCTGCCCATCGCC GGCGTGCTGCTGCCCACCATCCCCGGCAA GCTGGACGTGAACAAGAGCAAGACCCACAT CAGCGTGAACGGCAGGAAGATCAGGATGA GGTGCAGGGCCATCGACGGCGACGTGACC TTCTGCAGGCCCAAGAGCCCCGTGTACGTG GGCAACGGCGTGCACGCCAACCTGCACGT GGCCTTCCACAGGAGCAGCAGCGAGAAGA TCCACAGCAACGAGATCAGCAGCGACAGCA TCGGCGTGCTGGGCTACCAGAAGACCGTG GACCACACCAAGGTGAACAGCAAGCTGAG CCTGTTCTTCGAGATCAAGAGC(配列番号399)
3	ムンプス免疫エピトープ1	GTYRLIPNARANLTA(配列番号400)	GGCACCTACAGGCTGATCCCCAACGCCAG GGCCAACCTGACCGCC(配列番号401)
4	ムンプス免疫エピトープ2 ムンプス免疫エピトープ1	PSKFFTISDSATFAPG PVSNA(配列番号402) PSKLFIMLDNATFAP GPVVNA(配列番号404)	Ccgagcaaatttttaccattagcgatagcgcgacctttgcgccgg gcccggtgagcaacgcg(配列番号403) Ccgagcaaactgtttattatgctggataacgcgacctttgcgccgg gcccggtggtgaacgcg(配列番号405) ワクチン株JL5と発生株(表2)との間の発生株(表1)の発散のうち赤血球凝集素-ノイラミニダーゼ(HN)多様性から選択された例
5	風疹ウイルス(RV)	TPPPYQVSCGGESDR ASARVIDPAAQS(配列番号406)	ACCCCCCCCCCCTACCAGGTGAGCTGCGG CGGCGAGAGCGACAGGGCCAGCGCCAGGG TGATCGACCCCGCCGCCCAGAGC(配列番号407)
6	ヘマグルチニン	PEYAYKIVKNKKMED GFLQGMVDGWYGH HSNEQGSGLMENER TLDKANPNNDLCSW SDHEASSNNTNQEDL LQRESRRKKRIGTSTL	CCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAC AAGAAGATGGAGGACGGCTTCCTGCAGGG CATGGTGGACGGCTGGTACGGCCACCACA GCAACGAGCAGGGCAGCGGCCTGATGGAG AACGAGAGGACCCTGGACAAGGCCAACCC CAACAACGACCTGTGCAGCTGGAGCGACC

【表４１－４】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
		NQRGNCNTKCQTEEARLKREEVSLVKSDQCSNGSLQCRANNSTEQVD(配列番号408)	ACGAGGCCAGCAGCAACAACACCAACCAGGAGGACCTGCTGCAGAGGGAGAGCAGGAGGAAGAAGAGGATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGGGGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACCGAGGAGGCCAGGCTGAAGAGGGAGGAGGTGAGCCTGGTGAAGAGCGACCAGTGCAGCAACGGCAGCCTGCAGTGCAGGGCCAACAACAGCACCGAGCAGGTGGAC(配列番号409)
7	ノイラミニダーゼ	TKSTNSRSGGISGPDNEAPVGEAPSPYGDNPRPNDGNNIRIGSKGYNGIITDTIEESCSCYPDAKVVKSVELDSTIWTSGSSPNQKIITIGWDPNGWTGTPMSPNGAYGTDGPSNGQANQHQAESISAGNSSLCPIRDNWHGSNRSWSWPDGAE(配列番号410)	ACCAAGAGCACCAACAGCAGGAGCGGCGGCATCAGCGGCCCCGACAACGAGGCCCCCGTGGGCGAGGCCCCCAGCCCCTACGGCGACAACCCCAGGCCCAACGACGGCAACAACATCAGGATCGGCAGCAAGGGCTACAACGGCATCATCACCGACACCATCGAGGAGAGCTGCAGCTGCTACCCCGACGCCAAGGTGGTGAAGAGCGTGGAGCTGGACAGCACCATCTGGACCAGCGGCAGCAGCCCCAACCAGAAGATCATCACCATCGGCTGGGACCCCAACGGCTGGACCGGCACCCCCATGAGCCCCAACGGCGCCTACGGCACCGACGGCCCCAGCAACGGCCAGGCCAACCAGCACCAGGCCGAGAGCATCAGCGCCGGCAACAGCAGCCTGTGCCCCATCAGGGACAACTGGCACGGCAGCAACAGGAGCTGGAGCTGGCCCGACGGCGCCGAG(配列番号411)	
8	H5N1ウイルスヘマグルチニンのTAP1(輸送抗原提示)	EKIVLLLAMMEKIVLLLAKCQTPMGAIKAVDGVTNKCPYLGSPSF(配列番号412)	GAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCAAGTGCCAGACCCCCATGGGCGCCATCAAGGCCGTGGACGGCGTGACCAACAAGTGCCCCTACCTGGGCAGCCCCAGCTTC(配列番号413)
9	h5n1ウイルスノイラミニダーゼのTAP2(輸送抗原提示)	IRPCFWVELNPNQKIITIRPCFWVELICYPDAGEIT(配列番号414)	ATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACC(配列番号415)
10	クラスI HLAに対するヘマグルチニンエピトープ	MEKIVLLLAEKIVLLLAMCPYLGSPSFKCQTPMGAIKAVDGVTNK(配列番号416)	ATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGTGCCCCTACCTGGGCAGCCCCAGCTTCAAGTGCCAGACCCCCATGGGCGCCATCAAGGCCGTGGACGGCGTGACCAACAAG(配列番号417)

【表４１－５】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
11	クラスI HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	NPNQKIITICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVELI(配列番号418)	AACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATC(配列番号419)
12	クラスII HLAに対するヘマグルチニンエピトープ	MVSLVKSDQIGTSTLNQR(配列番号420)	ATGGTGAGCCTGGTGAAGAGCGACCAGATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGG(配列番号421)
13	クラスII HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	YNGIITDTI(配列番号422)	TACAACGGCATCATCACCGACACCATC(配列番号423)
14	ヘマグルチニンエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	MEKIVLLLAEKIVLLLAMMVSLVKSDQCPYLGSPSFIGTSTLNQRKCQTPMGAIKAVDGVTNK(配列番号424)	ATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGATGGTGAGCCTGGTGAAGAGCGACCAGTGCCCCTACCTGGGCAGCCCCAGCTTCATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGG(配列番号425)
15	ノイラミニダーゼエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	NPNQKIITIYNGIITDTICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVELI(配列番号426)	AACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCTACAACGGCATCATCACCGACACCATCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATC(配列番号427)

【０８０７】

当該技術分野で公知の追加の免疫エピトープもまた組み入れられ得る。Immune Epitope Database and Analysis Resource(iedb.org/epitopedetails_v3.php)(これの内容は参照によって本願に組み込まれる)から利用可能な免疫エピトープのいずれかは、本明細書に開示のプライム編集因子によって組み入れられ得る。

【０８０８】

いくつかの態様では、本明細書に開示のプライム編集因子によって組み入れられ得る免疫エピトープは次のエピトープのいずれかを包含し得る:

【表４２－１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1	破傷風トキソイド	QYIKANSKFIGITEL	396	NA
2	ジフテリア毒素変異体CRM197	GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQK GIQKPKSGTQGNYDDDWKEFYSTDNKYDAAGY SVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVD NAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDG ASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALSVELEI NFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNRVRRSVG SSLSCINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMS ESPNKTVSEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELK TVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADN LEKTTAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVA QSIALSSLMVAQAIPLVGELVDIGFAAYNFVESII NLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVS WNTVEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGV LLPTIPGKLDVNKSKTHISVNGRKIRMRCRAIDG DVTFCRPKSPVYVGNGVHANLHVAFHRSSSEKI HSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIK S	428	NA
3	ムンプス	GTYRLIPNARANLTA	配列番号400	NA
4	ムンプス	PSKFFTISDSATFAPGPVSNA; PSKLFIMLDNATFAPGPVVNA	402; 404	NA
5	風疹ウイルス(RV)	TPPPYQVSCGGESDRASARVIDPAAQS	406	NA
6	ヘマグルチニン	PEYAYKIVKNKKMEDGFLQGMVDGWYGHHSN EQGSGLMENERTLDKANPNNDLCSWSDHEASS NNTNQEDLLQRESRRKKRIGTSTLNQRGNCNTK CQTEEARLKREEVSLVKSDQCSNGSLQCRANNS TEQVD	408	NA
7	ノイラミニダーゼ	TKSTNSRSGGISGPDNEAPVGEAPSPYGDNPRPN DGNNIRIGSKGYNGIITDTIEESCSCYPDAKVVKS VELDSTIWTSGSSPNQKIITIGWDPNGWTGTPMS PNGAYGTDGPSNGQANQHQAESISAGNSSLCPI RDNWHGSNRSWSWPDGAE	410	NA
8	H5N1ウイルスヘマグルチニンのTAP(輸送抗原提示)	EKIVLLLAMMEKIVLLLAKCQTPMGAIKAVDGV TNKCPYLGSPSF	412	NA
9	h5n1ウイルスノイラミニダーゼのTAP(輸送抗原提示)	IRPCFWVELNPNQKIITIRPCFWVELICYPDAGEI T	414	NA
10	クラスI HLAに対するヘマグルチニンエピトープ	MEKIVLLLAEKIVLLLAMCPYLGSPSFKCQTPM GAIKAVDGVTNK	416	NA
11	クラスI HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	NPNQKIITICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVEL I	418	NA
12	クラスII HLAに対する	MVSLVKSDQIGTSTLNQR	420	NA

【表４２－２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ヘマグルチニンエピトープ			
13	クラスII HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	YNGIITDTI	422	NA
14	ヘマグルチニンエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	MEKIVLLLAEKIVLLLAMMVSLVKSDQCPYLGSPSFIGTSTLNQRKCQTPMGAIKAVDGVTNK	424	NA
15	ノイラミニダーゼエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	NPNQKIITIYNGIITDTICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVELI	426	NA
16	ジフテリア菌	AACAGNRVRRSVGSSLKC	899	SRC280292
17	麻疹ウイルス株エドモンストン	AADHCPVVEVNGVTI	900	P69353.1
18	麻疹ウイルス株エドモンストン	AAHLPTGTPLDID	901	P04851.1
19	百日咳菌	AALAVWAGLAVQ	902	Q00879.1
20	麻疹ウイルス株エドモンストン	AALGVATAAQITAGI	903	P69353.1
21	風疹ウイルス株テリアン	AALLNTPPPYQVSCGGESDRATAR	904	P07566.1
22	風疹ウイルス	AAQSFTGVVYGTHTT	905	BAA28178.1
23	風疹ウイルス	ACEVEPAFGHSDAAC	906	BAA28178.1
24	風疹ウイルス	ACTFWAVNAYSSGGY	907	BAA28178.1
25	風疹ウイルス	ADDPLLR	908	BAA19893.1
26	風疹ウイルス	ADDPLLRT	909	CAJ88851.1
27	麻疹ウイルス株エドモンストン	AEMICDIDTYIVEAG	910	P04851.1
28	麻疹ウイルス株エドモンストン	AEMICDIDTYIVEAGLASFI	911	P04851.1
29	麻疹ウイルス株エドモンストン	AEPLLSC	912	P04851.1
30	百日咳菌	AFVSTSSSRRYTEVY	913	CAD44970.1
31	百日咳菌	AGFIYRETFCITTIYKTGQPAADHYYSKVTA	914	P04979.1
32	風疹ウイルス	AGLLACCAKCLYYLR	915	BAA28178.1
33	風疹ウイルス	AHTTSDPWHPPG	916	BAA19893.1
34	麻疹ウイルス株エドモンストン	AIAKLEDAKELLESS	917	P69353.1
35	麻疹ウイルス株エドモンストン	AIDNLRASLETTNQA	918	P69353.1
36	百日咳菌	AKGVEFR	919	ACI16088.1
37	麻疹ウイルス株エドモンストン	AKWAVPTTRTDDKLR	920	P08362.1
38	麻疹ウイルス株エドモンストン	ALAEVLKKPV	921	ABO69699.1

【表４２－３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
39	麻疹ウイルス株エドモンストン	ALGVINTLEWIPRFK	922	P08362.1
40	麻疹ウイルス株エドモンストン	ALHQSMLNSQAIDNL	923	P69353.1
41	麻疹ウイルス株エドモンストン	ALIGILSLFV	924	ABI54110.1
42	風疹ウイルス	ALLNTPPPYQVSCGGESDRA	925	CAJ88851.1
43	風疹ウイルス株M33	ALLNTPPPYQVSCGGESDRASARV	926	CAJ88851.1
44	風疹ウイルス	ALVEGLAPGGGNCHL	927	BAA28178.1
45	百日咳菌	AMAAWSERAGEA	928	P04977.1
46	麻疹ウイルス株エドモンストン	ANCASILCKCYTTGT	929	P69353.1
47	百日咳菌	ANPNPYTSRRSV	930	P04977.1
48	風疹ウイルス	APGPGEVW	931	CAJ88851.1
49	風疹ウイルス	APLPPHTTERIETRSARHPWRIR	932	ABD64214.1
50	風疹ウイルスワクチン株RA27/3	APPMPPQPPRAHGQHYGHHHHQLPFLG	933	CAA33016.1
51	風疹ウイルス株テリアン	APPTLPQPPCAHGQHYGHHHHQLPFLG	934	P07566.1
52	風疹ウイルス	APPTLPQPPRAHGQHYGHHHHQLPFLG	935	ABD64214.1
53	百日咳菌	APQPGPQPPQPPQPQPEAPAPQ	936	P14283.3
54	風疹ウイルス	AQLASYFNPGGSYYK	937	BAA28178.1
55	麻疹ウイルス株エドモンストン	ARAAHLPTGTPLD	938	P04851.1
56	麻疹ウイルス株エドモンストン	ARLVSEIAMHTTEDK	939	P04851.1
57	麻疹ウイルス株エドモンストン	ARLVSEIAMHTTEDKISRAV	940	P04851.1
58	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	ASDVETAEGGEIHELLR	941	P03422.1
59	麻疹モルビリウイルス	ASDVETAEGGEIHELLRLQ	942	ABO69699.1
60	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	ASDVETAEGGEIHELLRLQSR	943	P03422.1
61	麻疹モルビリウイルス	ASDVETAEGGEIHKLLRLQ	944	AAA63285.1
62	風疹ウイルス株M33	ASDVLPGHWLQG	945	NP_740663.1
63	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASELGITAEDARLVS	946	P04851.1
64	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASELGITAEDARLVSEIAMH	947	P04851.1
65	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASESSQDPQDSRR	948	P04851.1
66	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASILCKCYTTGTIIN	949	P69353.1
67	風疹ウイルス	ASPVCQRHSPDCSRL	950	BAA28178.1

【表４２－４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
68	百日咳菌	ASQARWTGATRA	951	BAF35031.1
69	風疹ウイルス株テリアン	ASYFNPGGSYYKQYHPTACEVEPAFGHS	952	P07566.1
70	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASYKVMTRSSHQSLV	953	P69353.1
71	百日咳菌	ASYVKKPKEDVD	954	ACI16088.1
72	麻疹ウイルス株エドモンストン	ATAAQITAGIALHQS	955	P69353.1
73	風疹ウイルス	ATPERPRL	956	CAJ88851.1
74	麻疹ウイルス株エドモンストン	AVCLGGLIGIPALIC	957	P69353.1
75	麻疹ウイルス株エドモンストン	AVGPRQAQVSF	958	P04851.1
76	風疹ウイルス	AVNAYSSGGYAQLAS	959	BAA28178.1
77	風疹ウイルス	AVSETRQTWAEWAAA	960	BAA28178.1
78	麻疹ウイルス株エドモンストン	AVTAPDTAADSELRR	961	P04851.1
79	麻疹ウイルス株エドモンストン	AVTAPDTAADSELRRWIKYT	962	P04851.1
80	百日咳菌	AYGGIIKDAPPGAGFIYRETFC	963	P04979.1
81	風疹ウイルス	CALPLAGLLACCAKC	964	BAA28178.1
82	風疹ウイルス	CARIWNGTQRACTFW	965	BAA28178.1
83	麻疹ウイルス株エドモンストン	CARTLVSGSFGNRFI	966	P69353.1
84	百日咳菌	CASPYEGRYRDMYDALRBRLLY	967	SRC280066
85	百日咳菌	CAVFVRSGQPVIGA	968	AAA83981.1
86	風疹ウイルス	CCAKCLYYLRGAIAPR	969	BAA28178.1
87	麻疹ウイルス株エドモンストン	CCRGRCNKKGEQVGM	970	P69353.1
88	風疹ウイルス	CEIPTDVSCEGLGAW	971	BAA28178.1
89	百日咳菌	CFGKDLKRPGSSPMEV	972	P0A3R5.1
90	麻疹モルビリウイルス	CFQQACKGKIQALCE	973	P06830.1
91	麻疹モルビリウイルス	CFQQACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPS	974	AAR89413.1
92	風疹ウイルス	CGGESDRASARVIDP	975	BAA28178.1
93	百日咳菌	CITTIYKTGQPAADHYYSKVTA	976	P04979.1
94	麻疹モルビリウイルス	CKGKIQALCENPEWA	977	AAR89413.1
95	麻疹ウイルス株エドモンストン	CKPWQESRKNKAQ	978	P04851.1
96	麻疹ウイルス株エドモンストン	CNKKGEQVGMSRPGL	979	P69353.1
97	風疹ウイルス	CNVTTEHPFCNTPHG	980	BAA28178.1
98	百日咳菌	CQVGSSNSAF	981	P04977.1

【表４２－５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
99	麻疹モルビリウイルス	CSGPTTIRGQFS	982	P08362.1
100	百日咳菌	CTSPYDGKYWSMYSRL	983	AAA83981.1
101	麻疹ウイルス株エドモンストン	CVLADSESGGHITHS	984	P08362.1
102	麻疹モルビリウイルス	CYTTGTIINQDPDKILTYIAADHC	985	AAF02706.1
103	風疹ウイルス	DADDPLLR	986	CAJ88851.1
104	麻疹ウイルス株エドモンストン	DARAAHLPTGTPLDI	987	P04851.1
105	麻疹ウイルス株エドモンストン	DARAAHLPTGTPLDIDTASE	988	P04851.1
106	麻疹ウイルス株エドモンストン	DCHAPTYLPAEVDGD	989	P08362.1
107	風疹ウイルス	DCSRLVGATPERPRL	990	BAA28178.1
108	麻疹ウイルス株エドモンストン	DDKLRMETCFQQACK	991	P08362.1
109	風疹ウイルス	DDPLLRTA	992	CAJ88851.1
110	風疹ウイルス	DDPLLRTAPGPGEVW	993	BAA28178.1
111	百日咳菌	DDPPATVYRYD	994	P04977.1
112	百日咳菌	DDPPATVYRYDSRPPED	995	CAD44970.1
113	百日咳菌	DDPPATVYRYDSRPPEDV	996	ACI04548.1
114	麻疹モルビリウイルス	DEVGLRTPQRFTDLV	997	P06830.1
115	麻疹ウイルス株エドモンストン	DHCPVVEVNGVTIQV	998	P69353.1
116	麻疹ウイルス株エドモンストン	DIDTASESSQDPQ	999	P04851.1
117	麻疹ウイルス株エドモンストン	DINKVLEKLGYSGGD	1000	P69353.1
118	百日咳菌	DLIAYKQ	1001	ACI16088.1
119	麻疹ウイルス株エドモンストン	DLIGQKLGLKLLRYY	1002	P69353.1
120	風疹ウイルス	DLQKALEAQSRALRAELAA	1003	P07566.1
121	麻疹モルビリウイルス	DLQYVLATYDTSRVE	1004	P06830.1
122	麻疹ウイルス株エドモンストン	DLSLRRFMV	1005	P04851.1
123	麻疹ウイルス株エドモンストン	DLSNCMVALGELKLA	1006	P08362.1
124	風疹ウイルス	DLVEYIMNYTGNQQSRWGLGSPNC	1007	CAJ88851.1
125	麻疹モルビリウイルス	DLVKFISDKIKFLNP	1008	AAR89413.1
126	麻疹モルビリウイルス	DLVKFISTKIKFLNP	1009	SRC280117
127	麻疹ウイルス株エドモンストン	DLYKSNHNNV	1010	P08362.1
128	百日咳菌	DNVLDHLTGR	1011	ACI04548.1
129	百日咳菌	DNVLDHLTGRSC	1012	P04977.1

【表４２－６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
130	百日咳菌	DNVLDHLTGRSCQ	1013	P04977.1
131	麻疹モルビリウイルス	DPDKILTYIAA	1014	AAF02706.1
132	風疹ウイルス株テリアン	DPGDLVEYIMNYTGNQQSR	1015	P07566.1
133	風疹ウイルス	DPLLRTAP	1016	CAJ88851.1
134	風疹ウイルス	DPLLRTAPGPGEVWVTPVIGSQ	1017	CAJ88851.1
135	麻疹ウイルス株エドモンストン	DPQDSRRSAEPLL	1018	P04851.1
136	麻疹ウイルス株エドモンストン	DPVIDRLYLSSHRGV	1019	P08362.1
137	麻疹ウイルス株エドモンストン	DQILRSMKGLSSTSI	1020	P69353.1
138	麻疹モルビリウイルス	DQYCADVAAEELMNA	1021	P06830.1
139	麻疹ウイルス株エドモンストン	DSESGGHITH	1022	P08362.1
140	麻疹ウイルス株エドモンストン	DTASESSQDPQDS	1023	P04851.1
141	風疹ウイルス	DTVMSVFALASYVQH	1024	BAA28178.1
142	百日咳菌	DVFQNGFTAWGNND	1025	P04977.1
143	風疹ウイルス	DVGAVPPGKFVTAAL	1026	BAA28178.1
144	ジフテリア菌	DVNKSKTHISVNGRKI	1027	CAE11230.1
145	風疹ウイルス	DVSCEGLGAWVPAAP	1028	BAA28178.1
146	風疹ウイルス株テリアン	DWASPVCQRHSPDCSRLVGATPERPRL	1029	P07566.1
147	麻疹ウイルス株エドモンストン	EARESYRETGPSR	1030	P04851.1
148	百日咳菌	EAVEAERAGRGTG	1031	ACI04548.1
149	麻疹ウイルス株エドモンストン	EDAKELLESSDQILR	1032	P69353.1
150	麻疹ウイルス株エドモンストン	EDRRVKQSRGEAR	1033	P04851.1
151	麻疹ウイルス株エドモンストン	EDSITIPYQGSGKGV	1034	P08362.1
152	風疹ウイルス	EEAFTYLCTAPGCAT	1035	BAA28178.1
153	麻疹ウイルス株エドモンストン	EGFNMILGTILAQIW	1036	P04851.1
154	麻疹ウイルス株エドモンストン	EGFNMILGTILAQIWVLLAK	1037	P04851.1
155	風疹ウイルス	EHPFCNTPHGQLEVQ	1038	BAA28178.1
156	麻疹ウイルス株エドモンストン	EISDIEVQDPEGFNM	1039	P04851.1
157	麻疹ウイルス株エドモンストン	EISDIEVQDPEGFNMILGTI	1040	P04851.1
158	麻疹ウイルス株エドモ	EKPNLSSKRSE	1041	P08362.1

【表４２－７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
159	麻疹ウイルス株エドモンストン	ELKLAALCHGEDSIT	1042	P08362.1
160	麻疹モルビリウイルス	ELMNALVNSTLLETR	1043	P06830.1
161	麻疹ウイルス株エドモンストン	ELPRL	1044	P04851.1
162	麻疹モルビリウイルス	ENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDL	1045	AAR89413.1
163	麻疹ウイルス株エドモンストン	EPIRDALNAMTQNIR	1046	P69353.1
164	麻疹ウイルス株エドモンストン	EQVGMSRPGLKPDLT	1047	P69353.1
165	風疹ウイルス	ERPRLRLV	1048	CAJ88851.1
166	風疹ウイルス	ERPRLRLVDADDPLL	1049	BAA28178.1
167	麻疹ウイルスCAM/RB	ESPGQLIQRITDDPDVS	1050	P04851.1
168	麻疹ウイルス株エドモンストン	ESRGIKARITHVDTE	1051	P69353.1
169	麻疹ウイルス株エドモンストン	ESSCTFMPEGTVCSQ	1052	P69353.1
170	麻疹ウイルス株エドモンストン	ESSQDPQDSRRSA	1053	P04851.1
171	麻疹ウイルス株エドモンストン	ETRTTNQFLAVSKGN	1054	P08362.1
172	麻疹ウイルス株エドモンストン	EVDGDVKLSSNLVIL	1055	P08362.1
173	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	EVNGVTIQV	1056	P26031.1
174	風疹ウイルス	EVWVTPVI	1057	CAJ88851.1
175	風疹ウイルス	EVWVTPVIGSQA	1058	BAA19893.1
176	風疹ウイルス	EWAAAHWWQLTLGAT	1059	BAA28178.1
177	麻疹モルビリウイルス	EWIPRFKVSPYLFTV	1060	P06830.1
178	百日咳菌	FEYVDTYGDNAG	1061	P04977.1
179	麻疹モルビリウイルス	FGPLITHGSGMDLYK	1062	P06830.1
180	麻疹ウイルス株エドモンストン	FIFDALAEV	1063	ABK40531.1
181	麻疹ウイルス株エドモンストン	FISDKIKFL	1064	P08362.1
182	麻疹ウイルス株エドモンストン	FKRNKDKPPITSGSG	1065	P04851.1
183	麻疹ウイルス株エドモンストン	FKRNKDKPPITSGSGGAIRG	1066	P04851.1
184	風疹ウイルス	FKTVRPVALPRTLAP	1067	BAA28178.1
185	麻疹ウイルス株エドモンストン	FLMDRHIIV	1068	ABK40531.1

【表４２－８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
186	麻疹ウイルス株エドモンストン	FMAVLLTLQTPTGQI	1069	P69353.1
187	麻疹ウイルス株エドモンストン	FMPEGTVCSQNALYP	1070	P69353.1
188	麻疹モルビリウイルス	FMYMSLLGV	1071	AAN09804.1
189	麻疹ウイルス株エドモンストン	FNVPIKEAGEDCHAP	1072	P08362.1
190	麻疹モルビリウイルス	FRDLTWCINPPERIK	1073	AAC35876.2
191	麻疹ウイルス株エドモンストン	FSHDDPISSDQSRFG	1074	P04851.1
192	麻疹ウイルス株エドモンストン	FSHDDPISSDQSRFGWFENK	1075	P04851.1
193	麻疹モルビリウイルス	FTDLVKFISDKIKFL	1076	P06830.1
194	麻疹モルビリウイルス	FTWDQKLWCRHFCVL	1077	P06830.1
195	百日咳菌	FVRDGQSVIGACASPYEGRYRDLYDALRRLLY	1078	SRC280066
196	百日咳菌	FVRSGQPVIGACTSPYDGKYWSILYSRLRKMLY	1079	SRC280066
197	麻疹モルビリウイルス	FYKDNPHPKGSRIVI	1080	P06830.1
198	百日咳菌	GAASSYFEYVDTYG	1081	ACI04548.1
199	百日咳菌	GAFDLKTTFCIMTTRNTGQPA	1082	AAA83981.1
200	麻疹ウイルス株エドモンストン	GALIGILSLFVESPG	1083	P04851.1
201	麻疹ウイルス株エドモンストン	GALIGILSLFVESPGQLIQR	1084	P04851.1
202	風疹ウイルス	GATPERPR	1085	CAJ88851.1
203	百日咳菌	GAYGRCPNGTRALTVAELRGNAEL	1086	P04979.1
204	風疹ウイルス	GCFAPWDLEATGACI	1087	BAA28178.1
205	麻疹モルビリウイルス	GDINKVLEKLGYS	1088	BAB60865.1
206	麻疹モルビリウイルス	GDINKVLEKLGYSGGDLLG	1089	AAL29688.1
207	風疹ウイルス	GDLRAVHHRPVPA	1090	CAA28880.1
208	風疹ウイルス	GDLVEYIMNYTGNQQ	1091	BAA28178.1
209	麻疹ウイルス株エドモンストン	GDSSITTRSRLLDRL	1092	P04851.1
210	麻疹ウイルス株エドモンストン	GDSSITTRSRLLDRLVRLIG	1093	P04851.1
211	麻疹モルビリウイルス	GEDCHAPTYLPAEVD	1094	P06830.1
212	麻疹ウイルス株エドモンストン	GELSTLESLMNLYQQ	1095	P04851.1
213	麻疹ウイルス株エドモンストン	GELSTLESLMNLYQQMGKPA	1096	P04851.1
214	ムンプスルブラウイルス	GEQARYLALLEA	1097	P21186.1
215	風疹ウイルス	GEVWVT	1098	BAA19893.1
216	風疹ウイルス	GEVWVTPV	1099	CAJ88851.1

【表４２－９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
217	風疹ウイルス	GEVWVTPVIGSQAR	1100	BAA19893.1
218	百日咳菌	GEYGGVIKDGTPGGA	1101	AAA83981.1
219	風疹ウイルス	GFLSGVGPMRLRHGADT	1102	SRC265968
220	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GFRASDVETAEGGEIHELLRLQ	1103	P03422.1
221	百日咳菌	GGAVPGGAVPGGAVPGGFGPGGFGP	1104	P14283.3
222	百日咳菌	GGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGP	1105	CAA09475.1
223	百日咳菌	GGAVPGGAVPGGFGPGGFGPGGFGPGGFGP	1106	CAA09474.1
224	麻疹モルビリウイルス	GGHITHSGMVGMGVS	1107	P06830.1
225	麻疹モルビリウイルス	GILESRGIKARITHVDTESY	1108	P26032.1
226	百日咳菌	GITGETTTTEYSNARYV	1109	CAD44970.1
227	麻疹ウイルス株エドモンストン	GKEDRRVKQSRGE	1110	P04851.1
228	百日咳菌	GKVTNGS	1111	ACI16088.1
229	風疹ウイルス	GLGAWVPAAPCARIW	1112	BAA28178.1
230	麻疹ウイルス株エドモンストン	GLIGIPALICCCRGR	1113	P69353.1
231	風疹ウイルス株テリアン	GLLACCAKCLYYLRGAIAPR	1114	P07566.1
232	麻疹モルビリウイルス	GLLAIAGIRLHRAAI	1115	P06830.1
233	風疹ウイルス	GLQPRADMAAPPTLPQ	1116	NP_740663.1
234	麻疹モルビリウイルス	GMGVSCTVTREDGTNRR	1117	AAR89413.1
235	麻疹モルビリウイルス	GMYGGTYLVEKP	1118	AAR89413.1
236	百日咳菌	GNAELQTYLRQITPGWSIYGLYDGTYLG	1119	P04979.1
237	風疹ウイルス	GNCHLTVNGEDVGAV	1120	BAA28178.1
238	百日咳菌	GNNDNVLDHLTGR	1121	P04977.1
239	百日咳菌	GNNDNVLDHLTGRSC	1122	P04977.1
240	麻疹ウイルス株エドモンストン	GNRFILSQGNLIANC	1123	P69353.1
241	風疹ウイルス	GNRGRGQRRDWSRAPPPPEERQETRSQTPAPKPS	1124	P07566.1
242	風疹ウイルス	GPGEVWVT	1125	CAJ88851.1
243	風疹ウイルス株テリアン	GPMRLRHGADTRCGRLI	1126	P07566.1
244	百日咳菌	GPNHTKV	1127	ACI16083.1
245	麻疹ウイルス株ハレ	GPRQAQVSF	1128	P10050.1
246	麻疹ウイルス株エドモンストン	GPRQAQVSFLQGDQS	1129	P04851.1
247	麻疹ウイルス株エドモンストン	GPRQAQVSFLQGDQSENELP	1130	P04851.1
248	麻疹モルビリウイルス	GRGYNVSSIVTMTSQ	1131	P06830.1
249	百日咳菌	GRTPFII	1132	ACI16083.1

【表４２－１０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
250	風疹ウイルス	GSPNCHGPDWASPVC	1133	BAA28178.1
251	風疹ウイルス	GSQARKCGLHIRAGP	1134	BAA28178.1
252	百日咳菌	GSSNSAFVSTSSSRR	1135	P04977.1
253	麻疹ウイルス株エドモンストン	GSTKSCARTLVSGSF	1136	P69353.1
254	風疹ウイルス	GSYYKQYHPTACEVE	1137	BAA28178.1
255	風疹ウイルス	GTHTTAVSETRQTWA	1138	BAA28178.1
256	麻疹ウイルス株エドモンストン	GTIINQDPDKILTYI	1139	P69353.1
257	百日咳菌	GTLVRMAPVIG	1140	ADA85124.1
258	麻疹ウイルス株エドモンストン	GTPLDIDTASESS	1141	P04851.1
259	百日咳菌	GTYLGQAYGGIIKDAPPGAGFIYRETFC	1142	P04979.1
260	百日咳菌	GVATKGLGVHAKSSDWG	1143	P15318.2
261	ジフテリア菌	GVLLPTIPGKLDVNKSKTHI	1144	AAV70486.1
262	麻疹モルビリウイルス	GVLSVDLSLTVELKI	1145	P06830.1
263	麻疹モルビリウイルス	GVPIELQVECFTWDQ	1146	P06830.1
264	麻疹ウイルス株エドモンストン	GVSCTVTREDGTNRR	1147	P08362.1
265	麻疹ウイルス株エドモンストン	GVSYNIGSQEWYTTV	1148	P69353.1
266	麻疹ウイルス株エドモンストン	GYNVSSIVTMTSQGM	1149	P08362.1
267	麻疹モルビリウイルス	HFCVLADSESGGHIT	1150	P06830.1
268	麻疹モルビリウイルス	HGEDSITIPYQGSGK	1151	P06830.1
269	風疹ウイルス	HGPDWASP	1152	BAA19893.1
270	風疹ウイルス	HGPDWASPVCQRHSP	1153	BAA28178.1
271	風疹ウイルス	HGPDWASPVCQRHSPDCSRLVG	1154	CAJ88851.1
272	風疹ウイルス株M33	HGPDWASPVCQRHSPDCSRLVGATPERPRLRLV	1155	CAJ88851.1
273	麻疹ウイルス株エドモンストン	HITHSGMEGMGVSCT	1156	P08362.1
274	麻疹モルビリウイルス	HKSLSTNLDVTNSIE	1157	P06830.1
275	麻疹ウイルス株エドモンストン	HLMIDRPYV	1158	P08362.1
276	麻疹ウイルス株エドモンストン	HLPTGTPLDIDTA	1159	P04851.1
277	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	HLPTGTPLDIDTATESSQDPQDSR	1160	Q77M43.1
278	麻疹モルビリウイルス	HMTNYLEQPVSNDLS	1161	P06830.1
279	麻疹ウイルス株エドモンストン	HQSLVIKLMPNITLL	1162	P69353.1
280	麻疹モルビリウイルス	HRAAIYTAEIHKSLS	1163	P06830.1

【表４２－１１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
281	百日咳菌	HRMQEAVEAERAGRGTGH	1164	P04977.1
282	麻疹ウイルス株エドモンストン	HVDTESYFIVLSIAY	1165	P69353.1
283	麻疹ウイルス株エドモンストン	HWGNLSKIGVVGIGS	1166	P69353.1
284	風疹ウイルス	HWWQLTLGATCALPL	1167	BAA28178.1
285	風疹ウイルス	HYRNASDVLPGHWLQGGWGCYNL	1168	NP_740663.1
286	麻疹ウイルス株エドモンストン	IDLGPPISLERLDVG	1169	P69353.1
287	麻疹ウイルス株エドモンストン	IEAIRQAGQEMILAV	1170	P69353.1
288	風疹ウイルス株M33	IETRSARHP	1171	CAA28880.1
289	麻疹ウイルス株エドモンストン	IGSQEWYTTVPKYVA	1172	P69353.1
290	麻疹ウイルス株エドモンストン	IKGVIVHRLEGVSYN	1173	P69353.1
291	麻疹ウイルス株エドモンストン	IKHIIIVPIPGDSSI	1174	P04851.1
292	麻疹ウイルス株エドモンストン	IKHIIIVPIPGDSSITTRSR	1175	P04851.1
293	百日咳菌	IKLKDCP	1176	ACI16083.1
294	麻疹ウイルス株エドモンストン	IKLMPNITLLNNCTR	1177	P69353.1
295	麻疹モルビリウイルス	ILLERLDVGT	1178	AAF85664.1
296	麻疹モルビリウイルス	ILPGQDLQYV	1179	P08362.1
297	麻疹ウイルス株エドモンストン	ILTYIAADHCPVVEV	1180	P69353.1
298	麻疹モルビリウイルス	INQDPDKILTY	1181	AAL29688.1
299	麻疹ウイルス株エドモンストン	IPRFKVSPYLFNVPI	1182	P08362.1
300	麻疹ウイルス株エドモンストン	IQALSYALGGDINKV	1183	P69353.1
301	風疹ウイルス	IRAGPYGHATVEMPE	1184	BAA28178.1
302	百日咳菌	IRMGTDK	1185	ACI16088.1
303	麻疹ウイルス株エドモンストン	ISNFDESSCTFMPEG	1186	P69353.1
304	麻疹ウイルス株エドモンストン	ITAGIALHQSMLNSQ	1187	P69353.1
305	麻疹ウイルス株エドモンストン	ITDDPDVSIRLLEVV	1188	P04851.1
306	麻疹ウイルス株エドモンストン	ITDDPDVSIRLLEVVQSDQS	1189	P04851.1
307	百日咳菌	ITTYV	1190	ACI16083.1
308	麻疹ウイルス株エドモンストン	IVEAGLASFILTIKF	1191	P04851.1

【表４２－１２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
309	麻疹ウイルス株エドモンストン	IVEAGLASFILTIKFGIETM	1192	P04851.1
310	麻疹ウイルス株エドモンストン	IVEAGLASFILTIKFGIETMYPALG	1193	P04851.1
311	風疹ウイルス	KALEAQSRALRAELAA	1194	P07566.1
312	麻疹ウイルス株エドモンストン	KARITHVDTESYFIV	1195	P69353.1
313	風疹ウイルス	KCGLHIRAGPYGHAT	1196	BAA28178.1
314	麻疹ウイルス株エドモンストン	KCYTTGTIINQDPDK	1197	P69353.1
315	麻疹ウイルス株エドモンストン	KDNPHPKGSR	1198	P08362.1
316	麻疹ウイルス株エドモンストン	KDNRIPSYGVLSVDL	1199	P08362.1
317	麻疹モルビリウイルス	KFLNPDREYDFRDLT	1200	AAC35876.2
318	風疹ウイルス	KFVTAALLN	1201	BAA28178.1
319	麻疹ウイルス株エドモンストン	KGNCSGPTTIR	1202	P08362.1
320	麻疹モルビリウイルス	KIKFLNPDREYDFRD	1203	P06830.1
321	風疹ウイルス	KIVDGGCFAPWDLEA	1204	BAA28178.1
322	麻疹ウイルス株エドモンストン	KLGLKLLRYYTEILS	1205	P69353.1
323	麻疹ウイルス株エドモンストン	KLGVWKSPTDMQSWV	1206	P08362.1
324	百日咳菌	KLKECPQ	1207	ACI16088.1
325	麻疹モルビリウイルス	KLLRYYTEI	1208	P26031.1
326	麻疹ウイルス株エドモンストン	KLMPFSGDFV	1209	ABK40531.1
327	麻疹モルビリウイルス	KLMPNITLL	1210	P26031.1
328	麻疹モルビリウイルス	KLRMETCFQQACKGKIQALCENPEWA	1211	AAR89413.1
329	麻疹モルビリウイルス	KLWCRHFCV	1212	P08362.1
330	麻疹ウイルス株エドモンストン	KLWCRHFCVL	1213	P08362.1
331	麻疹モルビリウイルス	KLWESPQEI	1214	BAB60863.1
332	麻疹ウイルス株エドモンストン	KMSSAVGFV	1215	ABO69699.1
333	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KMSSAVGFVPDTGPASR	1216	P03422.1
334	百日咳菌	KMVYATN	1217	ACI16083.1
335	麻疹ウイルス株エドモンストン	KPDLTGTSKSYVRSL	1218	P69353.1
336	麻疹モルビリウイルス	KPNLSSKRSELSQLS	1219	P08362.1
337	麻疹ウイルス株エドモンストン	KPNLSSKRSELSQLSMYRVF	1220	P08362.1

【表４２－１３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
338	麻疹ウイルス株エドモンストン	KQSRGEARESYRETG	1221	P04851.1
339	麻疹ウイルス株エドモンストン	KQSRGEARESYRETGPSRAS	1222	P04851.1
340	麻疹ウイルス株エドモンストン	KRFAGVVLAGAALGV	1223	P69353.1
341	麻疹ウイルス株エドモンストン	KRTPGNKPRIAEMIC	1224	P04851.1
342	麻疹ウイルス株エドモンストン	KRTPGNKPRIAEMICDIDTY	1225	P04851.1
343	麻疹モルビリウイルス	KSNHNNVYWLTIPPMKNLALGVINTL	1226	AAR89413.1
344	麻疹モルビリウイルス	KVSPYLFNV	1227	P08362.1
345	百日咳菌	KVVQLPKISKNALKANG	1228	ACI16083.1
346	百日咳菌	KVVQLPKISKNALRNDG	1229	ACI16087.1
347	百日咳菌	LAHRRIPPENIR	1230	P04977.1
348	百日咳菌	LALALWAGFALS	1231	P11092.1
349	風疹ウイルス	LAPGGGNCHLTVNGE	1232	BAA28178.1
350	麻疹ウイルス株エドモンストン	LAQIWVLLAKAVTAP	1233	P04851.1
351	麻疹ウイルス株エドモンストン	LAQIWVLLAKAVTAPDTAAD	1234	P04851.1
352	風疹ウイルス	LASYFNPGGSYYKQYHPTACEVEPAFGHS	1235	BAA19893.1
353	麻疹モルビリウイルス	LAVSKGNCSGPTTIR	1236	P06830.1
354	麻疹ウイルス株エドモンストン	LCENPEWAPLKDNRI	1237	P08362.1
355	麻疹モルビリウイルス	LDRLVRLIG	1238	ABI54110.1
356	ジフテリア菌	LEEEGVTPL	1239	P33120.2
357	百日咳菌	LEHRMQEAVEAERAGRGTGHFI	1240	CAD44970.1
358	麻疹ウイルス株エドモンストン	LEKLGYSGGDLLGIL	1241	P69353.1
359	麻疹ウイルス株エドモンストン	LEQPVSNDLS	1242	P08362.1
360	麻疹ウイルス株エドモンストン	LERKWLDVVRNIIAE	1243	P04851.1
361	麻疹ウイルス株エドモンストン	LERKWLDVVRNIIAEDLSLR	1244	P04851.1
362	麻疹ウイルス株エドモンストン	LFGPSLRDPISAEIS	1245	P69353.1
363	麻疹モルビリウイルス	LGELKLAALCHGEDS	1246	P06830.1
364	麻疹ウイルス株エドモンストン	LGGKEDRRVKQSR	1247	P04851.1
365	風疹ウイルス	LGHDGHHGGTLRVGQHHRNASDVL	1248	ABD64214.1
366	風疹ウイルス株テリアン	LGSPNCHGPDWASPVCQRHS	1249	P07566.1

【表４２－１４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
367	風疹ウイルス株テリアン	LGSPNCHGPDWASPVCQRHSPDCSRLV	1250	P07566.1
368	風疹ウイルス	LHDPDTEAPTEACVTSWL	1251	ABD64214.1
369	麻疹ウイルス株エドモンストン	LIANCASILCKCYTT	1252	P69353.1
370	麻疹モルビリウイルス	LIGLLAIAGIRLHRAAIYTAEIHK	1253	AAR89413.1
371	麻疹ウイルス株エドモンストン	LIPSMNQLSCDLIGQ	1254	P69353.1
372	麻疹ウイルス株エドモンストン	LKIKIASGFGPLITH	1255	P08362.1
373	麻疹モルビリウイルス	LKIKIASGFGPLITHGSGMDLYK	1256	AAR89413.1
374	百日咳菌	LKLYFEP	1257	ACI16088.1
375	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLAVLFVMFL	1258	P08362.1
376	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLDRLVRLIGNPDVS	1259	P04851.1
377	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLDRLVRLIGNPDVSGPKLT	1260	P04851.1
378	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLESSDQILRSMKGL	1261	P69353.1
379	麻疹モルビリウイルス	LLETRTTNQFLAVSK	1262	P06830.1
380	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLEVVQSDQSQSGLT	1263	P04851.1
381	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLEVVQSDQSQSGLTFASR	1264	P04851.1
382	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLEVVQSDQSQSGLTFASRG	1265	P04851.1
383	麻疹モルビリウイルス	LLGILESRGIKARIT	1266	AAL29688.1
384	風疹ウイルス	LLRTAPGP	1267	CAJ88851.1
385	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLRYYTEILSLFGPS	1268	P69353.1
386	風疹ウイルス株テリアン	LLVPWVLIFMVCRRACRRRG	1269	P07566.1
387	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLWRSRCKIV	1270	ABK40528.1
388	麻疹モルビリウイルス	LLWSYAMGV	1271	P04851.1
389	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLWSYAMGVGVELEN	1272	P04851.1
390	麻疹ウイルス株エドモンストン	LLWSYAMGVGVELENSMGGL	1273	P04851.1
391	麻疹モルビリウイルス	LMIDRPYVL	1274	P08362.1
392	麻疹ウイルス株エドモンストン	LNAMTQNIRPVQSVA	1275	P69353.1
393	風疹ウイルス	LNTPPPYQVSCGGES	1276	BAA28178.1
394	麻疹ウイルス株エドモ	LRDPISAEISIQALS	1277	P69353.1

【表４２－１５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
395	百日咳菌	LRGSGDLQEYLRHVTR	1278	AAA83981.1
396	風疹ウイルス	LRLVDADD	1279	CAJ88851.1
397	風疹ウイルス	LRLVDADDPLLR	1280	BAA19893.1
398	風疹ウイルス	LRLVDADDPLLRTAPGPGEVWVTPVIGSQAR	1281	BAA19893.1
399	百日咳菌	LRRLLYMIYMSGLAVRVHVSKEEQYYDY	1282	P04979.1
400	風疹ウイルス	LRTAPGPG	1283	CAJ88851.1
401	風疹ウイルス	LRVGQHYRNASDVLPGHWLQ	1284	NP_740663.1
402	百日咳菌	LRYLA	1285	ACI16088.1
403	麻疹ウイルス株エドモンストン	LSCKPWQESRKNK	1286	P04851.1
404	麻疹モルビリウイルス	LSEIKGVIVHRLEGV	1287	AAL29688.1
405	麻疹ウイルス株エドモンストン	LSIAYPTLSEIKGVI	1288	P69353.1
406	麻疹ウイルス株エドモンストン	LSLLDLYLGRGYNVS	1289	P08362.1
407	麻疹ウイルス株エドモンストン	LSQGNLIANCASILC	1290	P69353.1
408	麻疹モルビリウイルス	LSSHRGVIADNQAKW	1291	P06830.1
409	麻疹ウイルス株エドモンストン	LSVDLSLTVELKIKI	1292	P08362.1
410	百日咳菌	LTGISICNPGSSLC	1293	AAA83981.1
411	麻疹ウイルス株エドモンストン	LTIKFGIETMYPALG	1294	P04851.1
412	麻疹ウイルス株エドモンストン	LTIKFGIETMYPALGLHEFA	1295	P04851.1
413	麻疹ウイルス株エドモンストン	LTLQTPTGQIHWGNL	1296	P69353.1
414	風疹ウイルス	LVDADDPL	1297	CAJ88851.1
415	風疹ウイルス	LVDADDPLLR	1298	BAA19893.1
416	麻疹ウイルス株エドモンストン	LVEKPNLSSKRSELS	1299	P08362.1
417	風疹ウイルス	LVGATPE	1300	BAA19893.1
418	風疹ウイルス	LVGATPER	1301	CAJ88851.1
419	麻疹モルビリウイルス	LVKLGVWKSPTGMQS	1302	P06830.1
420	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	LVSGSFGNRFILSQGNLI	1303	P26031.1
421	麻疹ウイルス株エドモンストン	LYKSNHNNVYWLTIP	1304	P08362.1
422	麻疹ウイルス株エドモンストン	LYPMSPLLQECLRGSTKSCARTLVS	1305	P69353.1
423	風疹ウイルス	MASTTPITMEDLQKALEA	1306	P07566.1
424	風疹ウイルス	MASTTPITMEDLQKALEAQSR	1307	ABD64200.1

【表４２－１６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
425	風疹ウイルス株テリアン	MASTTPITMEDLQKALEAQSRALRAELAA	1308	P07566.1
426	風疹ウイルス	MASTTPITMEDLQKALEAQSRALRAGLAA	1309	ABD64200.1
427	風疹ウイルスワクチン株RA27/3	MASTTPITMEDLQKALETQSRVLRAGLTA	1310	CAA33016.1
428	麻疹ウイルス株エドモンストン	MATLLRSLALFKRNK	1311	P04851.1
429	麻疹ウイルス株エドモンストン	MATLLRSLALFKRNKDKPPI	1312	P04851.1
430	麻疹モルビリウイルス	MDLYKSNHNNVYWLT	1313	P06830.1
431	風疹ウイルス	MEDLQKALEAQSRA	1314	P07566.1
432	風疹ウイルス	MEDLQKALEAQSRALRAELAA	1315	P07566.1
433	麻疹ウイルス株エドモンストン	MGLKVNVSAIFMAVL	1316	P69353.1
434	麻疹モルビリウイルス	MIDRPYVLLAVLFVM	1317	P06830.1
435	麻疹ウイルス株エドモンストン	MILAVQGVQDYINNE	1318	P69353.1
436	麻疹ウイルス株エドモンストン	MLNSQAIDNLRASLE	1319	P69353.1
437	麻疹ウイルス株エドモンストン	MNALVNSTLLETRTT	1320	P08362.1
438	風疹ウイルス	MNYTGNQQSRWGLGSPNCHGPDWASPVCQRHS	1321	BAA19893.1
439	麻疹ウイルス株エドモンストン	MQSWVPLSTDDPVID	1322	P08362.1
440	麻疹モルビリウイルス	MSLSLLDLYLGRGYN	1323	P06830.1
441	麻疹ウイルス株エドモンストン	MSPLLQECLRGSTKS	1324	P69353.1
442	麻疹モルビリウイルス	MSPQRDRINAFYKDN	1325	P06830.1
443	麻疹モルビリウイルス	MYRVFEVSVIRNPGL	1326	P06830.1
444	麻疹ウイルス株エドモンストン	NALYPMSPLLQECLR	1327	P69353.1
445	風疹ウイルス株テリアン	NCHGPDWASPVCQRHSPDCSRLVGAT	1328	P07566.1
446	麻疹ウイルス株エドモンストン	NFGRSYFDPAYFRLG	1329	P04851.1
447	麻疹ウイルス株エドモンストン	NFGRSYFDPAYFRLGQEMVR	1330	P04851.1
448	風疹ウイルス	NGTQRACTFWAVNAY	1331	BAA28178.1
449	麻疹ウイルス株エドモンストン	NGVTIQVGSRRYPDA	1332	P69353.1
450	麻疹ウイルス株エドモンストン	NIIAEDLSLRRFMVA	1333	P04851.1
451	麻疹ウイルス株エドモンストン	NIIAEDLSLRRFMVALILDI	1334	P04851.1

【表４２－１７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
452	麻疹ウイルス株エドモンストン	NITLLNNCTRVEIAE	1335	P69353.1
453	麻疹モルビリウイルス	NLALGVINTLEWIPR	1336	P06830.1
454	ジフテリア菌	NLFQVVHWSYNRPAYSPG	1337	SRC280292
455	麻疹ウイルス株エドモンストン	NLVILPGQDLQYVLA	1338	P08362.1
456	麻疹ウイルス株エドモンストン	NLYQQMGKPAPYMVN	1339	P04851.1
457	麻疹ウイルス株エドモンストン	NLYQQMGKPAPYMVNLENSI	1340	P04851.1
458	麻疹ウイルス株エドモンストン	NNCTRVEIAEYRRLL	1341	P69353.1
459	麻疹ウイルス株エドモンストン	NPDREYDFRD	1342	P08362.1
460	麻疹ウイルス株ハレ	NPDVSGPKL	1343	P10050.1
461	麻疹ウイルス株エドモンストン	NPDVSGPKLTGALIG	1344	P04851.1
462	麻疹ウイルス株エドモンストン	NPDVSGPKLTGALIGILSLF	1345	P04851.1
463	麻疹モルビリウイルス	NPPERIKLDYDQYCA	1346	P06830.1
464	麻疹モルビリウイルス	NQAKWAVPTTRTDDK	1347	P06830.1
465	麻疹モルビリウイルス	NQDPDKILTYIAADH	1348	AAF02706.1
466	麻疹ウイルス株エドモンストン	NQLSCDLIGQKLGLK	1349	P69353.1
467	風疹ウイルス	NQQSRWGLGSPNCHGPDWASPVCQRHS	1350	ABD64214.1
468	ムンプスルブラウイルス	NSTLGVKSAREF	1351	ABP48111.1
469	風疹ウイルス	NTPHGQLEVQVPPDP	1352	BAA28178.1
470	麻疹ウイルス株エドモンストン	NVSAIFMAVLLTLQT	1353	P69353.1
471	麻疹モルビリウイルス	PAEVDGDVKLSSNLV	1354	P06830.1
472	風疹ウイルス	PAFGHSDAACWGFPT	1355	BAA28178.1
473	麻疹ウイルス株エドモンストン	PALICCCRGRCNKKG	1356	P69353.1
474	麻疹モルビリウイルス	PDKILTYIAADHC	1357	AAF02706.1
475	麻疹ウイルス株エドモンストン	PERIKLDYDQYCADV	1358	P08362.1
476	風疹ウイルス	PERPRLRL	1359	CAJ88851.1
477	風疹ウイルス	PGCATQAPVPVRLAG	1360	BAA28178.1
478	風疹ウイルスワクチン株RA27/3	PGCATQAPVPVRLAGVRFESKIVDGGCFA	1361	CAJ88851.1
479	風疹ウイルス	PGEVWVTP	1362	CAJ88851.1
480	風疹ウイルス	PGEVWVTPVIGSQAR	1363	BAA28178.1
481	ジフテリア菌	PGKLDVNKSKTHISVN	1364	CAE11230.1

【表４２－１８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
482	麻疹ウイルス株エドモンストン	PGLGAPVFHMTNYLE	1365	P08362.1
483	風疹ウイルス	PGPGEVWV	1366	CAJ88851.1
484	風疹ウイルス	PHKTVRVKFHTETRT	1367	BAA28178.1
485	麻疹モルビリウイルス	PIELQVECFTWDQKL	1368	AAR89413.1
486	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	PISLERLDVG	1369	P26031.1
487	麻疹ウイルス株エドモンストン	PISLERLDVGTNLGN	1370	P69353.1
488	百日咳菌	PKALFTQQGGAYGRC	1371	P04979.1
489	麻疹ウイルス株エドモンストン	PKYVATQGYLISNFD	1372	P69353.1
490	麻疹ウイルス株エドモンストン	PLDIDTASESSQD	1373	P04851.1
491	風疹ウイルス	PLGLKFKTVRPVALP	1374	BAA28178.1
492	麻疹ウイルス株エドモンストン	PLITHGSGMDLYKSN	1375	P08362.1
493	麻疹モルビリウイルス	PLKDNRIPSYGVLSV	1376	P06830.1
494	風疹ウイルス	PLLRTAPG	1377	CAJ88851.1
495	麻疹ウイルス株エドモンストン	PLLSCKPWQESRK	1378	P04851.1
496	百日咳菌	PPATVYRYDSRPPE	1379	P04977.1
497	麻疹モルビリウイルス	PPISLERLDVGT	1380	AAL29688.1
498	風疹ウイルス	PPPPEERQETRSQTPAPKPS	1381	P07566.1
499	百日咳菌	PQEQITQHGSPYGRC	1382	AAA83981.1
500	百日咳菌	PQEQITQHGSPYGRCANK	1383	AAA83981.1
501	百日咳菌	PQPGPQPPQPPQPQPEAPAPQPPAG	1384	P14283.3
502	麻疹ウイルス株エドモンストン	PRLGGKEDRRVKQ	1385	P04851.1
503	風疹ウイルス	PRLRLVDA	1386	CAJ88851.1
504	風疹ウイルス	PRNVRVTGCYQCGTP	1387	BAA28178.1
505	麻疹ウイルス株エドモンストン	PSRASDARAAHLP	1388	P04851.1
506	麻疹ウイルス株エドモンストン	PTGQIHWGNLSKIGV	1389	P69353.1
507	麻疹ウイルス株エドモンストン	PTGTPLDIDTASE	1390	P04851.1
508	麻疹ウイルス株エドモンストン	PTLSEIKGVIVHRLE	1391	P69353.1
509	麻疹モルビリウイルス	PTTIRGQFSNMSLSL	1392	P06830.1
510	麻疹モルビリウイルス	PTTRTDDKLR	1393	AAR89413.1
511	麻疹モルビリウイルス	PTTRTDDKLRMETCFQQACKG	1394	AAR89413.1
512	風疹ウイルス	PVALPRTLAPPRNVR	1395	BAA28178.1

【表４２－１９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
513	ジフテリア菌	PVFAGANYAAWAVNVAQVI	1396	AAV70486.1
514	風疹ウイルス	PVIGSQAR	1397	CAJ88851.1
515	麻疹モルビリウイルス	PVVEVNGVTIQVGSR	1398	AAL29688.1
516	風疹ウイルス株テリアン	PWELVVLTARPEDGWTCRGV	1399	P07566.1
517	麻疹ウイルス株エドモンストン	PWQESRKNKAQTR	1400	P04851.1
518	麻疹ウイルス株エドモンストン	PYMVNLENSIQNKFS	1401	P04851.1
519	麻疹ウイルス株エドモンストン	PYMVNLENSIQNKFSAGSYP	1402	P04851.1
520	麻疹ウイルス株エドモンストン	PYQGSGKGVS	1403	P08362.1
521	風疹ウイルス	PYQVSCGGESDRASA	1404	BAA28178.1
522	麻疹モルビリウイルス	QACKGKIQALCEN	1405	P08362.1
523	麻疹ウイルス株エドモンストン	QAGQEMILAVQGVQD	1406	P69353.1
524	麻疹モルビリウイルス	QALCENPECVPLKDN	1407	P06830.1
525	百日咳菌	QALGALK	1408	ACI16088.1
526	風疹ウイルス	QAPVPVRLAGVRFES	1409	BAA28178.1
527	風疹ウイルス	QCGTPALVEGLAPGG	1410	BAA28178.1
528	麻疹ウイルス株エドモンストン	QDPDKILTYIAADHC	1411	P69353.1
529	麻疹ウイルス株エドモンストン	QECLRGSTKSCARTL	1412	P69353.1
530	百日咳菌	QEQITQHGSPYGRC	1413	AAA83981.1
531	麻疹ウイルス株エドモンストン	QESRKNKAQTRTP	1414	P04851.1
532	麻疹ウイルス株エドモンストン	QGDQSENELPRLGGK	1415	P04851.1
533	麻疹ウイルス株エドモンストン	QGDQSENELPRLGGKEDRRV	1416	P04851.1
534	ジフテリア菌	QGESGHDIKITAENTPLPIA	1417	AAV70486.1
535	麻疹モルビリウイルス	QGSGKGVSFQLVKLG	1418	P06830.1
536	麻疹ウイルス株エドモンストン	QGVQDYINNELIPSM	1419	P69353.1
537	風疹ウイルス	QLEVQVPPDPGDLVE	1420	BAA28178.1
538	麻疹モルビリウイルス	QLPEATFMV	1421	ABK40528.1
539	風疹ウイルス	QLPFLGHDGHHGGTLRVGQHYRNAS	1422	NP_740663.1
540	麻疹ウイルス株エドモンストン	QLSMYRVFEV	1423	P08362.1
541	百日咳菌	QLSNIT	1424	ACI16083.1
542	麻疹ウイルス株エドモンストン	QNIRPVQSVASSRRH	1425	P69353.1

【表４２－２０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
543	麻疹ウイルス株エドモンストン	QNKFSAGSYPLLWSY	1426	P04851.1
544	麻疹ウイルス株エドモンストン	QNKFSAGSYPLLWSYAMGVG	1427	P04851.1
545	麻疹ウイルス株エドモンストン	QNKFSAGSYPLLWSYAMGVGVELEN	1428	P04851.1
546	麻疹ウイルス株エドモンストン	QQACKGKIQALCENP	1429	P08362.1
547	麻疹ウイルス株エドモンストン	QQRRVVGEFRLERKW	1430	P04851.1
548	麻疹ウイルス株エドモンストン	QQRRVVGEFRLERKWLDVVR	1431	P04851.1
549	百日咳菌	QQTRANPNPYTSRRSVAS	1432	P04977.1
550	風疹ウイルス	QRHSPDCSRLVGATP	1433	BAA28178.1
551	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSGLTFASRGTNMED	1434	P04851.1
552	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSGLTFASRGTNMEDEADQY	1435	P04851.1
553	ジフテリア菌	QSIALSSLMVAQAIPLVGEL	1436	AAV70486.1
554	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSRFGWFENKEISDI	1437	P04851.1
555	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSRFGWFENKEISDIEVQDP	1438	P04851.1
556	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSRGEAR	1439	P04851.1
557	麻疹ウイルス株エドモンストン	QSRGEARESYRETGPSRA	1440	P04851.1
558	風疹ウイルス株テリアン	QTGRGGSAPRPELGPPTN	1441	P07566.1
559	風疹ウイルス株テリアン	QTPAPKPSRAPPQQPQPPRMQTGRG	1442	P07566.1
560	麻疹ウイルス株エドモンストン	QVGSRRYPDAVYLHR	1443	P69353.1
561	麻疹ウイルス株エドモンストン	QVSFLQGDQSENE	1444	P04851.1
562	風疹ウイルス	QYHPTACEVEPAFGH	1445	BAA28178.1
563	麻疹ウイルス株エドモンストン	QYVLATYDTSRVEHA	1446	P08362.1
564	百日咳菌	RANPNPYTSRRSV	1447	ACI04548.1
565	麻疹ウイルス株エドモンストン	RASDARAAHLPTG	1448	P04851.1
566	麻疹ウイルス株エドモンストン	RASLETTNQAIEAIR	1449	P69353.1
567	風疹ウイルス株テリアン	RCGRLICGLSTTAQYPPTRF	1450	P07566.1
568	百日咳菌	RDGQSVIGACASPYEGRYR	1451	P04979.1

【表４２－２１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
569	麻疹ウイルス株エドモンストン	RESYRETGPSRAS	1452	P04851.1
570	麻疹ウイルス株エドモンストン	RETGPSRASDARA	1453	P04851.1
571	ムンプスルブラウイルス	RFAKYQQQGRLEAR	1454	P21186.1
572	風疹ウイルス株テリアン	RFGAPQAFLAGLLLATVAVGTARA	1455	P07566.1
573	麻疹ウイルス株エドモンストン	RFMVALILDIKRTPG	1456	P04851.1
574	麻疹ウイルス株エドモンストン	RFMVALILDIKRTPGNKPRI	1457	P04851.1
575	麻疹ウイルス株エドモンストン	RGEARESYRETGP	1458	P04851.1
576	風疹ウイルス	RGTTPPAYG	1459	CAA28880.1
577	風疹ウイルス株M33	RIETRSARH	1460	ABD64214.1
578	百日咳菌	RILAGALATYQ	1461	P04977.1
579	百日咳菌	RIPPENIRRVT	1462	ACI04548.1
580	百日咳菌	RISNLND	1463	ACI16083.1
581	百日咳菌	RLANLNG	1464	ACI16088.1
582	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLDVGTNLGNAIAKL	1465	P69353.1
583	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLERKWLDV	1466	P04851.1
584	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLGGKEDRRVKQSRG	1467	P04851.1
585	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLGGKEDRRVKQSRGEARES	1468	P04851.1
586	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLLDRLVRL	1469	ABI54110.1
587	風疹ウイルス	RLRLVDAD	1470	CAJ88851.1
588	風疹ウイルス	RLRLVDADDPLLR	1471	BAA19893.1
589	風疹ウイルス	RLRLVDADDPLLRTAPGPGEVWVTPVIGSQA	1472	BAA19893.1
590	風疹ウイルス	RLRLVQDADDPLLRIAPGPGEVWVTPVIGSQA	1473	SRC265968
591	麻疹ウイルス株エドモンストン	RLSDNGYYTV	1474	ABK40528.1
592	風疹ウイルス	RLVDADDP	1475	CAJ88851.1
593	風疹ウイルス	RLVDADDPLLRTAPG	1476	BAA28178.1
594	風疹ウイルス	RLVGATPE	1477	CAJ88851.1
595	風疹ウイルス	RMQTGRGGSAPRPELGPPTNPFQAAVA	1478	ABD64216.1
596	麻疹モルビリウイルス	RMSKGVFKV	1479	ABY21184.1
597	麻疹モルビリウイルス	RNPGLGAPVFHMTNY	1480	P06830.1
598	風疹ウイルス	RPRLRLVD	1481	CAJ88851.1

【表４２－２２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
599	百日咳菌	RQAESSEAMAAWSERAGEA	1482	P04977.1
600	風疹ウイルス	RQTWAEWAAAHWWQL	1483	BAA28178.1
601	麻疹ウイルス株エドモンストン	RRVKQSRGEARES	1484	P04851.1
602	麻疹モルビリウイルス	RRYPDAVYL	1485	ACA09725.1
603	麻疹ウイルス株エドモンストン	RRYPDAVYLHRIDLG	1486	P69353.1
604	麻疹ウイルス株エドモンストン	RSAGKVSSTLASELG	1487	P04851.1
605	麻疹ウイルス株エドモンストン	RSAGKVSSTLASELGITAED	1488	P04851.1
606	麻疹ウイルス株エドモンストン	RSELSQLS	1489	P08362.1
607	麻疹ウイルス株エドモンストン	RSELSQLSMYRVFEV	1490	P08362.1
608	風疹ウイルス	RSQTPAPKPSRAPPQQPQPPRMQT	1491	ABD64214.1
609	風疹ウイルス	RTAPGPGE	1492	CAJ88851.1
610	風疹ウイルス	RTAPGPGEVWVTPVI	1493	BAA28178.1
611	麻疹モルビリウイルス	RTDDKLRMETCFQQA	1494	P06830.1
612	風疹ウイルス	RTLAPPRNVRVTGCY	1495	BAA28178.1
613	麻疹ウイルス株エドモンストン	RTVLEPIRDALNAMT	1496	P69353.1
614	麻疹ウイルス株エドモンストン	RVEHAVVYYVYSPSR	1497	P08362.1
615	麻疹ウイルス株エドモンストン	RVFEVGVIRNPGLGA	1498	P08362.1
616	百日咳菌	RVHVSKEEQYYDYEDATFE	1499	P04978.2
617	風疹ウイルス	RVIDPAAQ	1500	BAA28178.1
618	風疹ウイルス	RVKFHTETRTVWQLS	1501	BAA28178.1
619	百日咳菌	RVYHNGITGET	1502	ACI04548.1
620	百日咳菌	RYDSRPPEDVF	1503	ACI04548.1
621	麻疹ウイルス株エドモンストン	RYPDAVYLHRIDLGP	1504	P69353.1
622	麻疹ウイルス株エドモンストン	SAEISIQALSYALGG	1505	P69353.1
623	麻疹ウイルス株エドモンストン	SAEPLLSCKPWQESR	1506	P04851.1
624	麻疹ウイルス株エドモンストン	SAEPLLSCKPWQESRKNKAQ	1507	P04851.1
625	麻疹モルビリウイルス	SAGKVSSTLASELG	1508	P04851.1
626	麻疹ウイルス株エドモンストン	SAGKVSSTLASELGITAEDARLVS	1509	P04851.1
627	麻疹ウイルス株エドモンストン	SCTVTREDGT	1510	P08362.1

【表４２－２３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
628	風疹ウイルス	SDAACWGFPTDTVMS	1511	BAA28178.1
629	麻疹ウイルス株エドモンストン	SDARAAHLPTGTP	1512	P04851.1
630	風疹ウイルス株テリアン	SDWHQGTHVCHTKHMDFWCVEHD	1513	P07566.1
631	麻疹ウイルス株エドモンストン	SELRRWIKYTQQRRV	1514	P04851.1
632	麻疹ウイルス株エドモンストン	SELRRWIKYTQQRRVVGEFR	1515	P04851.1
633	麻疹ウイルス株エドモンストン	SELSQL	1516	P08362.1
634	麻疹ウイルス株エドモンストン	SELSQLS	1517	P08362.1
635	百日咳菌	SEYLAHRRIPPENIRRVTRV	1518	CAD44970.1
636	麻疹ウイルス株エドモンストン	SFLQGDQSENELP	1519	P04851.1
637	麻疹ウイルス株エドモンストン	SGKGVSFQLVKLGVW	1520	P08362.1
638	麻疹ウイルス株エドモンストン	SHRGVIADNQAKWAV	1521	P08362.1
639	麻疹ウイルス株エドモンストン	SIEHQVKDVLTPLFK	1522	P08362.1
640	麻疹ウイルス株エドモンストン	SKIGVVGIGSASYKV	1523	P69353.1
641	麻疹モルビリウイルス	SKRSELSQLSMYRVF	1524	P06830.1
642	麻疹モルビリウイルス	SLFVESPGQLIQRITDDPDVS	1525	ABI54110.1
643	麻疹ウイルス株エドモンストン	SLSTNLDVTNSIEHQ	1526	P08362.1
644	麻疹ウイルス株エドモンストン	SLSTNLDVTNSIEHQVKDVLTPLFK	1527	P08362.1
645	麻疹ウイルス株エドモンストン	SLWGSGLLML	1528	BAE98296.1
646	麻疹ウイルス株エドモンストン	SMKGLSSTSIVYILI	1529	P69353.1
647	麻疹モルビリウイルス	SMYRVFEVGV	1530	P08362.1
648	麻疹モルビリウイルス	SNDLSNCMVALGELK	1531	P06830.1
649	麻疹ウイルス株ハレ	SPGQLIQR	1532	P10050.1
650	麻疹ウイルス株エドモンストン	SQDPQDSRRSAEP	1533	P04851.1
651	麻疹モルビリウイルス	SRIVINREHLMIDRP	1534	P06830.1
652	麻疹ウイルス株エドモンストン	SRKNKAQTRTPLQ	1535	P04851.1
653	風疹ウイルス	SRLVGATP	1536	CAJ88851.1
654	風疹ウイルス	SRLVGATPERPRLRLVDADDPLLR	1537	CAJ88851.1
655	麻疹ウイルス株エドモ	SRPGLKPDLTGTSKS	1538	P69353.1

【表４２－２４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
656	百日咳菌	SRRSVASIVGTLVRM	1539	CAD44970.1
657	風疹ウイルス	SRWGLGSPNCHGPDW	1540	BAA28178.1
658	百日咳菌	SSATK	1541	ACI16088.1
659	風疹ウイルス	SSGGYAQLASYFNPG	1542	BAA28178.1
660	百日咳菌	SSLGNGV	1543	ACI16083.1
661	麻疹モルビリウイルス	SSNLVILPGQDLQYV	1544	P06830.1
662	麻疹ウイルス株エドモンストン	SSQDPQDSRRSAEPL	1545	P04851.1
663	麻疹ウイルス株エドモンストン	SSQDPQDSRRSAEPLLSCKP	1546	P04851.1
664	麻疹ウイルス株エドモンストン	SSRRHKRFAGVVLAG	1547	P69353.1
665	麻疹ウイルス株エドモンストン	SSTSIVYILIAVCLG	1548	P69353.1
666	百日咳菌	STPGIVI	1549	AAA83981.1
667	百日咳菌	STPGIVIPPQEQITQHGSPYGRC	1550	AAA83981.1
668	百日咳菌	STSSSRRYTEVY	1551	P04977.1
669	麻疹ウイルス株エドモンストン	SYFIVLSIAYPTLSE	1552	P69353.1
670	麻疹ウイルス株エドモンストン	SYRETGPSRASDA	1553	P04851.1
671	百日咳菌	SYVK	1554	ACI16083.1
672	風疹ウイルス	SYVQHPHKTVRVKFH	1555	BAA28178.1
673	風疹ウイルス	TAPGPGEV	1556	CAJ88851.1
674	百日咳菌	TATRLLSSTNSRLC	1557	AAA83981.1
675	麻疹モルビリウイルス	TDDPVIDRLYLSSHR	1558	P06830.1
676	麻疹ウイルス株エドモンストン	TEILSLFGPSLRDPI	1559	P69353.1
677	風疹ウイルス	TETRTVWQLSVAGVS	1560	BAA28178.1
678	百日咳菌	TEVYLEHRMQEAVE	1561	P04977.1
679	麻疹ウイルス株エドモンストン	TFMPEGTVCSQNALY	1562	P69353.1
680	風疹ウイルス	TGACICEIPTDVSCE	1563	BAA28178.1
681	百日咳菌	TGDLRAY	1564	ACI16083.1
682	麻疹モルビリウイルス	TGMQSWVPLSTDDPV	1565	P06830.1
683	風疹ウイルス	TGNQQSRWGLGSPNC	1566	BAA28178.1
684	麻疹ウイルス株エドモンストン	TGPSRASDARAAH	1567	P04851.1
685	麻疹モルビリウイルス	TGTIINQDPDKILTY	1568	AAF02706.1
686	風疹ウイルス	TGVVYGTHTTAVSET	1569	BAA28178.1
687	麻疹ウイルス株エドモ	TIRGQFSNMSLSLLD	1570	P08362.1

【表４２－２５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
688	風疹ウイルス	TLGATCALPLAGLLA	1571	BAA28178.1
689	麻疹モルビリウイルス	TLLNNCTRV	1572	P26031.1
690	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	TLNVPPPPDPGR	1573	P03422.1
691	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	TLNVPPPPDPGRASTSGTPIKK	1574	P03422.1
692	麻疹モルビリウイルス	TMTSQGMYGGTYPVE	1575	P06830.1
693	麻疹ウイルス株エドモンストン	TNLGNAIAKLEDAKE	1576	P69353.1
694	麻疹ウイルス株エドモンストン	TNMEDEADQYFSHDD	1577	P04851.1
695	麻疹ウイルス株エドモンストン	TNMEDEADQYFSHDDPISSD	1578	P04851.1
696	風疹ウイルス株M33	TNPFQAAVARGLRPP	1579	CAA28880.1
697	麻疹モルビリウイルス	TNSIEHQVKDVLTPL	1580	P06830.1
698	麻疹ウイルス株エドモンストン	TNYLEQPVSNDLSNC	1581	P08362.1
699	麻疹モルビリウイルス	TNYLEQPVSNDLSNCMVALGELKLAAL	1582	AAR89413.1
700	風疹ウイルス	TPERPRLR	1583	CAJ88851.1
701	風疹ウイルス株テリアン	TPERPRLRLVDADDPLLRTA	1584	P07566.1
702	麻疹ウイルス株ハレ	TPGNKPRIA	1585	P10050.1
703	麻疹ウイルス株エドモンストン	TPLDIDTASESSQDP	1586	P04851.1
704	麻疹ウイルス株エドモンストン	TPLDIDTASESSQDPQDSRR	1587	P04851.1
705	麻疹ウイルス株エドモンストン	TPLFKIIGDEVGLRT	1588	P08362.1
706	麻疹ウイルス株エドモンストン	TPLQCTM	1589	P04851.1
707	風疹ウイルス	TPVIGSQA	1590	CAJ88851.1
708	風疹ウイルス	TPVIGSQARK	1591	BAA19893.1
709	麻疹ウイルス株エドモンストン	TQGYLISNFDESSCT	1592	P69353.1
710	百日咳菌	TRANPNPYTSRRSVASIVGTLVRM	1593	P04977.1
711	風疹ウイルス	TRFGCAMRWGLPP	1594	NP_740663.1
712	百日咳菌	TRNTGQPATDHYYSNV	1595	AAA83981.1
713	麻疹ウイルス株エドモンストン	TRTPLQCTMTEIF	1596	P04851.1
714	風疹ウイルス	TRWHRLLRMPVR	1597	ABD64216.1
715	麻疹ウイルス株エドモンストン	TSGSGGAIRGIKHII	1598	P04851.1
716	麻疹ウイルス株エドモ	TSGSGGAIRGIKHIIIVPIP	1599	P04851.1

【表４２－２６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
717	麻疹ウイルス株エドモンストン	TSQGMYGGTYLVEKP	1600	P08362.1
718	麻疹モルビリウイルス	TSRVEHAVVYYVYSP	1601	P06830.1
719	百日咳菌	TSSSRRYTEVYL	1602	ACI04548.1
720	百日咳菌	TSYVG	1603	ACI16088.1
721	麻疹ウイルス株エドモンストン	TTEDKISRAVGPRQA	1604	P04851.1
722	麻疹ウイルス株エドモンストン	TTEDKISRAVGPRQAQVSFL	1605	P04851.1
723	風疹ウイルス株M33	TTERIETRSARHP	1606	ABD64214.1
724	麻疹ウイルス株エドモンストン	TTNQAIEAIRQAGQE	1607	P69353.1
725	風疹ウイルス	TTSDPWHPPGPLGLK	1608	BAA28178.1
726	麻疹ウイルス株エドモンストン	TVCSQNALYPMSPLL	1609	P69353.1
727	風疹ウイルス	TVNGEDVGAVPPGKF	1610	BAA28178.1
728	麻疹モルビリウイルス	TYPVEKPNLSSKRSE	1611	P06830.1
729	風疹ウイルス	VAGVSCNVTTEHPFC	1612	BAA28178.1
730	百日咳菌	VAPGIVIPPKALFTQQGGAYGRC	1613	P04979.1
731	風疹ウイルス	VCHTKHMDFWCVEHDRPPPATPTPL	1614	NP_740663.1
732	風疹ウイルス	VCQRHSPDCSRLVGATPER	1615	BAA19893.1
733	風疹ウイルス	VDADDPLL	1616	CAJ88851.1
734	風疹ウイルス	VDADDPLLRTAPGPGEVWVT	1617	BAA19893.1
735	ジフテリア菌	VDIGFAAYNFVESIINLFQV	1618	AAV70486.1
736	麻疹ウイルス株エドモンストン	VEIAEYRRLLRTVLE	1619	P69353.1
737	麻疹ウイルス株エドモンストン	VELENSMGGLNFGRS	1620	P04851.1
738	麻疹ウイルス株エドモンストン	VELENSMGGLNFGRSYFDPA	1621	P04851.1
739	麻疹モルビリウイルス	VELKIKIASGFGPLI	1622	P06830.1
740	風疹ウイルス	VEMDEWIHAHTTSD	1623	SRC265968
741	風疹ウイルス	VEMPEWIHAHTTSDP	1624	BAA28178.1
742	ジフテリア菌	VERRLVKVL	1625	P33120.2
743	麻疹モルビリウイルス	VESPGQLI	1626	ABI54110.1
744	麻疹ウイルス株エドモンストン	VESPGQLIQRITDDP	1627	P04851.1
745	麻疹ウイルス株エドモンストン	VESPGQLIQRITDDPDVSIR	1628	P04851.1
746	風疹ウイルス	VFALASYVQHPHKTV	1629	BAA28178.1
747	風疹ウイルス	VGATPERP	1630	CAJ88851.1

【表４２－２７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
748	風疹ウイルス	VGATPERPRL	1631	BAA19893.1
749	風疹ウイルス	VGATPERPRLRLVDA	1632	BAA28178.1
750	麻疹ウイルス株エドモンストン	VGIGSASYKVMTRSS	1633	P69353.1
751	麻疹ウイルス株エドモンストン	VGLRTPQRFTDLVKF	1634	P08362.1
752	ジフテリア菌	VHHNTEEIVAQSIALSSLMV	1635	AAV70486.1
753	麻疹ウイルス株エドモンストン	VHRLEGVSYNIGSQE	1636	P69353.1
754	風疹ウイルス	VIGSQARK	1637	CAJ88851.1
755	百日咳菌	VITGSI	1638	ACI16088.1
756	百日咳菌	VITGTI	1639	ACI16083.1
757	麻疹ウイルス株エドモンストン	VKQSRGEA	1640	P04851.1
758	麻疹ウイルス株エドモンストン	VLFVMFLSLI	1641	P08362.1
759	麻疹モルビリウイルス	VLFVMFLSLIGLLAI	1642	P06830.1
760	麻疹モルビリウイルス	VLTPLFKIIGDEVGL	1643	P06830.1
761	麻疹ウイルス株エドモンストン	VMTRSSHQSLVIKLM	1644	P69353.1
762	風疹ウイルス	VPAAPCARIWNGTQR	1645	BAA28178.1
763	風疹ウイルス	VPPDPGDLVEYIMNY	1646	BAA28178.1
764	麻疹ウイルス株エドモンストン	VQSVASSRRHKRFAG	1647	P69353.1
765	百日咳菌	VQTGGTSRTVTMRYLAS	1648	ACI16083.1
766	百日咳菌	VQVRI	1649	ACI16083.1
767	風疹ウイルス	VRAYNQPAGDV	1650	NP_740662.1
768	風疹ウイルス	VRFESKIVDGGCFAP	1651	BAA28178.1
769	風疹ウイルス	VRLAGVRFESKIVDG	1652	BAA28178.1
770	麻疹ウイルス株エドモンストン	VSGSFGNRFILSQGN	1653	P69353.1
771	百日咳菌	VSKEEQYYDYEDAT	1654	AAA83981.1
772	麻疹ウイルス株エドモンストン	VSKGNCSGPTTIRGQ	1655	P08362.1
773	風疹ウイルス	VTAALLNTPPPYQVS	1656	BAA28178.1
774	風疹ウイルス	VTGCYQCGTPALVEG	1657	BAA28178.1
775	風疹ウイルス	VTPVIGSQ	1658	CAJ88851.1
776	風疹ウイルス株テリアン	VTTEHPFCNTPHGQLEVQVPPD	1659	P07566.1
777	麻疹ウイルス株エドモンストン	VVLAGAALGVATAAQ	1660	P69353.1
778	風疹ウイルス	VWQLSVAGVSCNVTT	1661	BAA28178.1

【表４２－２８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
779	風疹ウイルス	VWVTPVIG	1662	CAJ88851.1
780	風疹ウイルス	VWVTPVIGSQAR	1663	BAA19893.1
781	麻疹ウイルス株エドモンストン	VYILIAVCLGGLIGI	1664	P69353.1
782	麻疹ウイルス株エドモンストン	VYLHRIDLGPPISLE	1665	P69353.1
783	百日咳菌	VYRYDSRP	1666	P04977.1
784	百日咳菌	VYRYDSRPPEDV	1667	P04977.1
785	麻疹モルビリウイルス	VYWLTIPPMKNLALG	1668	P06830.1
786	風疹ウイルス	WDLEATGACICEIPT	1669	BAA28178.1
787	麻疹モルビリウイルス	WDQKLWCRHFCVLAD	1670	AAR89413.1
788	風疹ウイルス	WGFPTDTVMSVFALA	1671	BAA28178.1
789	風疹ウイルス	WHPPGPLGLKFKTVR	1672	BAA28178.1
790	風疹ウイルス	WIHAHTTSDPWHPPG	1673	BAA28178.1
791	麻疹ウイルス株エドモンストン	WLTIPPMKNLALGVI	1674	P08362.1
792	麻疹ウイルス株エドモンストン	WQESRKNKAQTRTPLQCTMT	1675	P04851.1
793	風疹ウイルス	WVCIFMVCRRACR	1676	SRC265968
794	風疹ウイルス	WVTPVIGS	1677	CAJ88851.1
795	麻疹ウイルス株エドモンストン	WYTTVPKYVATQGYL	1678	P69353.1
796	麻疹ウイルス株エドモンストン	YALGGDINKVLEKLG	1679	P69353.1
797	麻疹ウイルス株エドモンストン	YAMGVGVELE	1680	P04851.1
798	麻疹モルビリウイルス	YAMGVGVELEN	1681	ABI54110.1
799	麻疹モルビリウイルス	YCADVAAEELMNALV	1682	AAR89413.1
800	麻疹モルビリウイルス	YDFRDLTWCINPPER	1683	P06830.1
801	百日咳菌	YFEPGPT	1684	ACI16083.1
802	風疹ウイルス	YFNPGGSYYKQYHPT	1685	BAA28178.1
803	麻疹ウイルス株エドモンストン	YFRLGQEMVRRSAGK	1686	P04851.1
804	麻疹ウイルス株エドモンストン	YFRLGQEMVRRSAGKVSSTL	1687	P04851.1
805	麻疹モルビリウイルス	YFYPFRLPIKGVPIE	1688	P06830.1
806	百日咳菌	YGDNAGRILAGALAT	1689	P04977.1
807	風疹ウイルス	YGHATVEMPEWIHAH	1690	BAA28178.1
808	風疹ウイルス	YIMNYTGNQQSRWGL	1691	BAA28178.1
809	麻疹ウイルス株エドモンストン	YINNELIPSMNQLSC	1692	P69353.1
810	風疹ウイルス	YLCTAPGCATQAPVP	1693	BAA28178.1

【表４２－２９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
811	麻疹モルビリウイルス	YLFTVPIKEAGEDCH	1694	P06830.1
812	麻疹ウイルス株エドモンストン	YLHDPEFNL	1695	ABK40531.1
813	麻疹ウイルス株エドモンストン	YLNMSRLFV	1696	ABK40531.1
814	麻疹ウイルス株ハレ	YPALGLHEF	1697	P10050.1
815	麻疹モルビリウイルス	YPALGLHEFA	1698	ABI54110.1
816	麻疹ウイルス株エドモンストン	YPALGLHEFAGELST	1699	P04851.1
817	麻疹ウイルス株エドモンストン	YPALGLHEFAGELSTLESLM	1700	P04851.1
818	麻疹ウイルス株エドモンストン	YPFRLPIKGVPIELQ	1701	P08362.1
819	麻疹ウイルス株ハレ	YPLLWSYAM	1702	P10050.1
820	ムンプスルブラウイルス	YQQQGRL	1703	P21186.1
821	百日咳菌	YQSEYLAHRR	1704	P04977.1
822	麻疹ウイルス株エドモンストン	YRETGPSRASDARAA	1705	P04851.1
823	麻疹ウイルス株エドモンストン	YRETGPSRASDARAAHLPTG	1706	P04851.1
824	風疹ウイルス	YRNASDVLPGHWLQGGWGCYNLSDW	1707	NP_740663.1
825	麻疹ウイルス株エドモンストン	YRRLLRTVLEPIRDA	1708	P69353.1
826	百日咳菌	YRYDSRPP	1709	P04977.1
827	麻疹ウイルス株エドモンストン	YSGGDLLGILESRGI	1710	P69353.1
828	百日咳菌	YSKVTATBLLASTNSRLCAVFVRDG	1711	SRC280066
829	麻疹ウイルス株エドモンストン	YSPSRSFSYFYPFRL	1712	P08362.1
830	風疹ウイルス株テリアン	YTGNQQSRWGLGSPNCHGPDWASPV	1713	P07566.1
831	麻疹モルビリウイルス	YVLLAVLFV	1714	P08362.1
832	麻疹モルビリウイルス	YVYSPGRSFSYFYPF	1715	P06830.1
833	百日咳菌	YYDYEDATFQTYALTGISLCNPAASIC	1716	P04979.1
834	麻疹モルビリウイルス	GDLLGILESRGIKAR	1717	AAF02706.1
835	麻疹モルビリウイルス	TVPKYVATQGYLISN	1718	AAL29688.1
836	麻疹モルビリウイルス	KPWDSPQEI	1719	P26035.1
837	麻疹モルビリウイルス	KPWESPQEI	1720	CAA34579.1
838	百日咳菌	ATYQSEYLAHRRIPP	1721	ACI04548.1
839	百日咳菌	CMARQAESSEAMAAWSERAGEAMVLVYYESIAYSF	1722	ACI04548.1
840	百日咳菌	CQVGSSNSAFVSTSSSRRYTEVYL	1723	ACI04548.1

【表４２－３０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
841	百日咳菌	DDPPATVYRYDSRPP	1724	ACI04548.1
842	百日咳菌	GALATYQSEYLAHRRIPP	1725	ACI04548.1
843	百日咳菌	MAAWSERAGEAMVLVYYESIAYSF	1726	ACI04548.1
844	百日咳菌	MVLVYYESIAYSF	1727	ACI04548.1
845	百日咳菌	PATVYRYDSRPPEDV	1728	ACI04548.1
846	百日咳菌	YDSRPPEDV	1729	ACI04548.1
847	百日咳菌	EPGITTNYDT	1730	ACI16087.1
848	百日咳菌	GDLRAYKMVYATNPQTQLSN	1731	ACI16083.1
849	百日咳菌	KNGDVEASAITTYVGFSVVYP	1732	ACI16083.1
850	百日咳菌	KVTNGSKSYTLRYLASYVK	1733	ACI16088.1
851	百日咳菌	QALGALKLYFEPGITTNYDTGDLIAYKQTYNASGN	1734	ACI16088.1
852	百日咳菌	YATNPQTQLS	1735	ACI16083.1
853	ジフテリア菌	DNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKV	1736	AAV70486.1
854	ジフテリア菌	ENFSSYHGTKPGYVDSI	1737	AAV70486.1
855	ジフテリア菌	KVDNAETIKKELGLSLTEP	1738	AAV70486.1
856	風疹ウイルス株M33	MEDLQKALEAQSRALRAGLAA	1739	CAA28880.1
857	ジフテリア菌	QKGIQKPKSGTQGNYDDDWKGFY	1740	AAV70486.1
858	風疹ウイルス株M33	RTGAWQRKDWSRAPPPPEERQESRSQTPAPKPSR	1741	CAA28880.1
859	風疹ウイルス	AAGASQSRRPRPPRHARAQHLPEMTPAVT	1742	SRC265968
860	風疹ウイルス	CVTSWLWSEGEGAVFYRVDLHFINLGTP	1743	CAA28880.1
861	風疹ウイルス	FRVGGTRWHRLLRMPVRGLDGDTAPLP	1744	CAA28880.1
862	ジフテリア菌	GRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGN	1745	1007216A
863	風疹ウイルス	GTPPLDEDGRWDPALMYNPCGPEPPAHV	1746	CAA28880.1
864	ジフテリア菌	GVHANLHVAFHRSSSEKIHSNEISSDSIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLFFEIKS	1747	AAV70486.1
865	風疹ウイルス	MASTTPITMEDLQKALEAQSRALRAGLAAG	1748	ABD64200.1
866	風疹ウイルス	PELGPPTNPFQAAVARGLRPPLHDPDTEAPTEAC	1749	CAA28880.1
867	風疹ウイルス	PLPPHTTERIETRSARHPWRIRFGAP	1750	CAA28880.1
868	風疹ウイルス	SRAPPPPEERQESRSQTPAPKPSRAPP	1751	CAA28880.1
869	風疹ウイルス	SRAPPQQPQPPRMQTGRGGSAPRPELGP	1752	CAA28880.1
870	風疹ウイルス	TPAVTPEGPAPPRTGAWQRKDWSRAPP	1753	CAA28880.1
871	風疹ウイルス	VRAYNQPAGDVRGVWGKGERTYAEQDFRV	1754	CAA28880.1
872	風疹ウイルス	AFGHSDAACWGFPTDTVMSV	1755	CAA28880.1
873	風疹ウイルス	CARIWNGTQRACTFWAVNAYS	1756	CAA28880.1
874	風疹ウイルス	EEAFTYLCTAPGCATQTPVPVR	1757	CAA28880.1
875	風疹ウイルス	FAPWDLEATGACICEIPTDV	1758	CAA28880.1

【表４２－３１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
876	風疹ウイルス	GEDVGAFPPGKFVTAAL	1759	CAA28880.1
877	風疹ウイルス	GEVWVTPVIGSQARKCGLHI	1760	CAA28880.1
878	風疹ウイルス	GQLEVQVPPDPGDLVEYIMN	1761	CAA28880.1
879	風疹ウイルス	GSYYKQYHPTACEVEPAFGH	1762	CAA28880.1
880	風疹ウイルス	IHAHTTSDPWHPPGPLGLKF	1763	CAA28880.1
881	風疹ウイルス	IMNYTGNQQSRWGLGSPNCH	1764	CAA28880.1
882	風疹ウイルス	LHIRAGPYGHATVEMPEWIH	1765	CAA28880.1
883	風疹ウイルス	LKFKTVRPVALPRALAPPRN	1766	CAA28880.1
884	風疹ウイルス	LNTPPPYQVSCGGESDRASAGH	1767	CAA28880.1
885	風疹ウイルス	NCHGPDWASPVCQRHSPDCS	1768	CAA28880.1
886	風疹ウイルス	PDCSRLVGATPERPRLRLVD	1769	CAA28880.1
887	風疹ウイルス	PRNVRVTGCYQCGTPALVEG	1770	CAA28880.1
888	風疹ウイルス	PTDVSCEGLGAWVPTAPCARI	1771	CAA28880.1
889	風疹ウイルス	RLVDADDPLLRTAPGPGEVW	1772	CAA28880.1
890	風疹ウイルス	SVFALASYVQHPHKTVRVKF	1773	CAA28880.1
891	風疹ウイルス	VEGLAPGGGNCHLTVNGEDV	1774	CAA28880.1
892	風疹ウイルス	VKFHTETRTVWQLSVAGVSC	1775	CAA28880.1
893	風疹ウイルス	VPVRLAGVGFESKIVDGGCF	1776	CAA28880.1
894	風疹ウイルス	VSCNVTTEHPFCNTPHGQLE	1777	CAA28880.1
895	百日咳菌	AAASSPDAHVPF	1778	AAA22983.1
896	百日咳菌	AASSPDA	1779	AAA22983.1
897	百日咳菌	AKLGAAASSPDA	1780	AAA22983.1
898	百日咳菌	AMKPYEVTPTRM	1781	AAA22983.1
899	百日咳菌	AMTHLSPALADVPYVLVKTNMVVTS	1782	AAA22983.1
900	百日咳菌	ASSPDAHVPFCF	1783	AAA22983.1
901	百日咳菌	ASSPDAHVPFCFGKDLKRPGSSPME	1784	AAA22983.1
902	百日咳菌	CFGKDLKRPGSS	1785	AAA22983.1
903	百日咳菌	CFGKDLKRPGSSPMEVMLRAVFMQQ	1786	AAA22983.1
904	百日咳菌	CGIAAKLGAAAS	1787	AAA22983.1
905	百日咳菌	CGIAAKLGAAASSPDAHVPFCFGKD	1788	AAA22983.1
906	百日咳菌	DAHVPFCFGKDL	1789	AAA22983.1
907	百日咳菌	DLKRPGSSPMEV	1790	AAA22983.1
908	百日咳菌	DVPYVLVKTNMV	1791	AAA22983.1
909	百日咳菌	DVPYVLVKTNMVVTSVAMKPYEVTPT	1792	AAA22983.1
910	百日咳菌	EVMLRAVFMQQR	1793	AAA22983.1
911	百日咳菌	FEGKPALELIRM	1794	AAA22983.1
912	百日咳菌	FLGPKQLTFEGK	1795	AAA22983.1
913	百日咳菌	FLGPKQLTFEGKPALELIRMVECSG	1796	AAA22983.1

【表４２－３２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
914	百日咳菌	FMQQRPLRMFLGPKQLT	1797	AAA22983.1
915	百日咳菌	GKDLKRPGSSPM	1798	AAA22983.1
916	百日咳菌	GKDLKRPGSSPME	1799	AAA22983.1
917	百日咳菌	GKPALELIRMVE	1800	AAA22983.1
918	百日咳菌	GPKQLTFEGKPA	1801	AAA22983.1
919	百日咳菌	HVPFCFGKDLKR	1802	AAA22983.1
920	百日咳菌	IAAKLGAAASSP	1803	AAA22983.1
921	百日咳菌	KPYEVTPTRMLV	1804	AAA22983.1
922	百日咳菌	KQLTFEGKPALE	1805	AAA22983.1
923	百日咳菌	KRPGSSPMEVML	1806	AAA22983.1
924	百日咳菌	LELIRMVECSGK	1807	AAA22983.1
925	百日咳菌	LGAAASSPDAHV	1808	AAA22983.1
926	百日咳菌	LIRMVECSGKQD	1809	AAA22983.1
927	百日咳菌	LVCGIAAKLGAA	1810	AAA22983.1
928	百日咳菌	MKPYEVTPTRM	1811	AAA22983.1
929	百日咳菌	MLRAVFMQQRPL	1812	AAA22983.1
930	百日咳菌	MQQRPLRM	1813	AAA22983.1
931	百日咳菌	MQQRPLRMFLGP	1814	AAA22983.1
932	百日咳菌	MVVTSVAMKPYE	1815	AAA22983.1
933	百日咳菌	MVVTSVAMKPYEVTPTRMLVCGIAA	1816	AAA22983.1
934	百日咳菌	PALELIRMVECS	1817	AAA22983.1
935	百日咳菌	PALELIRMVECSGK	1818	AAA22983.1
936	百日咳菌	PFCFGKDLKRPG	1819	AAA22983.1
937	百日咳菌	PGSSPMEVMLRA	1820	AAA22983.1
938	百日咳菌	PGSSPMEVMLRAVF	1821	AAA22983.1
939	百日咳菌	PKQLTFEGK	1822	AAA22983.1
940	百日咳菌	PLRMFLGPKQLT	1823	AAA22983.1
941	百日咳菌	PTRMLVCGIAAK	1824	AAA22983.1
942	百日咳菌	PYVLVKTNMVVT	1825	AAA22983.1
943	百日咳菌	QLTFEGKPALELIRMVECSGKQDCP	1826	AAA22983.1
944	百日咳菌	QRPLRMFLGPKQ	1827	AAA22983.1
945	百日咳菌	RAVFMQQRPLRM	1828	AAA22983.1
946	百日咳菌	RMFLGPKQLTFE	1829	AAA22983.1
947	百日咳菌	RMLVCGIAAKLG	1830	AAA22983.1
948	百日咳菌	RMVECSGKQDCP	1831	AAA22983.1
949	百日咳菌	SPDAHVPFCFGK	1832	AAA22983.1
950	百日咳菌	SSPMEVMLRAVF	1833	AAA22983.1
951	百日咳菌	SSPMEVMLRAVFMQQRPLRMFLGPK	1834	AAA22983.1

【表４２－３３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
952	百日咳菌	SVAMKPYEVTPT	1835	AAA22983.1
953	百日咳菌	VECSGKQDCP	1836	AAA22983.1
954	百日咳菌	VFMQQRPLRMFL	1837	AAA22983.1
955	百日咳菌	VFMQQRPLRMFLGPKQLTFEGKPAL	1838	AAA22983.1
956	百日咳菌	VKTNMVVTSVAM	1839	AAA22983.1
957	百日咳菌	VLVKTNMVVTSV	1840	AAA22983.1
958	百日咳菌	VTPTRMLVCGIA	1841	AAA22983.1
959	百日咳菌	VTSVAMKPYEVT	1842	AAA22983.1
960	百日咳菌	YEVTPTRMLVCG	1843	AAA22983.1
961	百日咳菌	YEVTPTRMLVCGIAAKLGAAASSPD	1844	AAA22983.1
962	百日咳菌	CASPYEGRYRDMYDALR	1845	P04979.1
963	百日咳菌	CAVFVRDGQSV	1846	P04979.1
964	百日咳菌	CITTIYKTG	1847	P04979.1
965	百日咳菌	CPNGTRALTV	1848	P04979.1
966	百日咳菌	DALRRLLYMIYMSG	1849	P04979.1
967	風疹ウイルス株テリアン	GNRGRGQRRDWSRAPPPPEERQETRS	1850	P07566.1
968	百日咳菌	GQPAADHYYSKVT	1851	P04979.1
969	風疹ウイルス	GSPNCHGPDWASPVCQRHS	1852	ABD64214.1
970	麻疹ウイルス株エドモンストン	HKSLSTNLDVTNSIEHQ	1853	P08362.1
971	百日咳菌	LFTQQGGAYGRC	1854	P04979.1
972	麻疹ウイルス株エドモンストン	LIGLLAIAGIRLHRAAIYTAEI	1855	P08362.1
973	麻疹モルビリウイルス	PDTAADSELRRWIKY	1856	ABI54110.1
974	風疹ウイルス株テリアン	PNCHGPDWASPVCQRHS	1857	P07566.1
975	風疹ウイルス	QTPAPKPSRAPPQQPQPPRMQTGR	1858	ABD64216.1
976	風疹ウイルスワクチン株RA27/3	RAGLTAGASQSRRPRPPR	1859	CAA33016.1
977	風疹ウイルスワクチン株RA27/3	RFGAPQAFLAGLLLAAVAVGTARA	1860	ABD64214.1
978	百日咳菌	RGNAELQTYLRQITPG	1861	P04979.1
979	百日咳菌	RVHVSKEEQYYDYED	1862	P04979.1
980	百日咳菌	SIYGLYDGTYL	1863	P04979.1
981	百日咳菌	SKVTATRLLASTNS	1864	P04979.1
982	百日咳菌	TQQGGAYGRCPNGTRA	1865	P04979.1
983	百日咳菌	VAPGIVIPPKAL	1866	P04979.1
984	百日咳菌	DSRPPEDVFQNGFTAWG	1867	ACI04548.1
985	百日咳菌	EHRMQEAVEAERAGR	1868	ACI04548.1
986	麻疹ウイルス株エドモ	ETCFQQACKGKIQALCENPEWA	1869	P08362.1

【表４２－３４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
987	百日咳菌	EYVDTYGDNAGRILAGALATYQ	1870	ACI04548.1
988	百日咳菌	HRRIPPENIRRVTR	1871	ACI04548.1
989	百日咳菌	MARQAESSE	1872	ACI04548.1
990	百日咳菌	MQEAVEAERAGR	1873	ACI04548.1
991	百日咳菌	SQQTRANPNPYTSRR	1874	ACI04548.1
992	百日咳菌	TRANPNPYTSRRSVASIVGTLVHG	1875	SRC280066
993	百日咳菌	TVYRYDSRPPED	1876	ACI04548.1
994	麻疹モルビリウイルス	NDRNLLD	1877	P10050.1
995	麻疹モルビリウイルス	NMEDEADQYFSHDDPISSDQSRFGWFENK	1878	P04851.1
996	麻疹モルビリウイルス	SRASDARAAHLPTGTPLDID	1879	P04851.1
997	百日咳菌	EDVFQNGFTAW	1880	ACI04548.1
998	ジフテリア菌	AEGSSSVEYINNWEQAK	1881	AAV70486.1
999	ジフテリア菌	GPIKNKMSESPNKT	1882	AAV70486.1
1000	麻疹ウイルス株ハレ	GPKLTGALIGILSLFVESPGQLIQRITDDPDV	1883	P10050.1
1001	ジフテリア菌	GYQKTVDHTKVNSK	1884	AAV70486.1
1002	ジフテリア菌	KTVDH	1885	AAV70486.1
1003	ジフテリア菌	SESPNK	1886	AAV70486.1
1004	ジフテリア菌	AEGSSSVEYINNWEQAKALS	1887	AAV70486.1
1005	ジフテリア菌	AQAIPLVGELVDIGFAAYNF	1888	AAV70486.1
1006	ジフテリア菌	ASRVVLSLPFAEGSSSVEYI	1889	AAV70486.1
1007	ジフテリア菌	CINLDWDVIRDKTKTKIESL	1890	AAV70486.1
1008	ジフテリア菌	CRAIDGDVTFCRPKSPVYVG	1891	AAV70486.1
1009	ジフテリア菌	CRPKSPVYVGNGVHANLHVA	1892	AAV70486.1
1010	ジフテリア菌	DAAGYSVDNENPLSGKAGGV	1893	AAV70486.1
1011	ジフテリア菌	DKTKTKIESLKEHGPIKNKM	1894	AAV70486.1
1012	ジフテリア菌	EEFIKRFGDGASRVVLSLPF	1895	AAV70486.1
1013	ジフテリア菌	EKAKQYLEEFHQTALEHPEL	1896	AAV70486.1
1014	ジフテリア菌	FHRSSSEKIHSNEISSDSIG	1897	AAV70486.1
1015	ジフテリア菌	GADDVVDSSKSFVMENFSSY	1898	CAE11230.1
1016	ジフテリア菌	GKRGQDAMYEYMAQACAGNR	1899	AAV70486.1
1017	ジフテリア菌	GSVMGIADGAVHHNTEEIVA	1900	AAV70486.1
1018	ジフテリア菌	GTQGNYDDDWKGFYSTDNKY	1901	AAV70486.1
1019	ジフテリア菌	HDGYAVSWNTVEDSIIRTGF	1902	AAV70486.1
1020	ジフテリア菌	HGTKPGYVDSIQKGIQKPKS	1903	AAV70486.1
1021	ジフテリア菌	HQTALEHPELSELKTVTGTN	1904	AAV70486.1
1022	ジフテリア菌	IQKGIQKPKSGTQGNYDDDW	1905	AAV70486.1
1023	ジフテリア菌	KEHGPIKNKMSESPNKTVSE	1906	AAV70486.1

【表４２－３５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1024	ジフテリア菌	KGFYSTDNKYDAAGYSVDNE	1907	AAV70486.1
1025	ジフテリア菌	LDVNKSKTHISVNGRKIRMR	1908	AAV70486.1
1026	風疹ウイルス	MASTIPITMEDLQKALEA	1909	SRC265968
1027	ジフテリア菌	NGVHANLHVAFHRSSSEKIH	1910	AAV70486.1
1028	ジフテリア菌	NNWEQAKALSVELEINFETR	1911	AAV70486.1
1029	ジフテリア菌	NPLSGKAGGVVKVTYPGLTK	1912	AAV70486.1
1030	ジフテリア菌	PVFAGANYAAWAVNVAQVID	1913	AAV70486.1
1031	ジフテリア菌	SELKTVTGTNPVFAGANYAA	1914	AAV70486.1
1032	ジフテリア菌	SESPNKTVSEEKAKQYLEEF	1915	AAV70486.1
1033	ジフテリア菌	SETADNLEKTTAALSILPGI	1916	AAV70486.1
1034	ジフテリア菌	SFVMENFSSYHGTKPGYVDS	1917	AAV70486.1
1035	ジフテリア菌	SNEISSDSIGVLGYQKTVDH	1918	AAV70486.1
1036	ジフテリア菌	SPGHKTQPFLHDGYAVSWNT	1919	AAV70486.1
1037	ジフテリア菌	SVNGRKIRMRCRAIDGDVTF	1920	AAV70486.1
1038	ジフテリア菌	TAALSILPGIGSVMGIADGA	1921	AAV70486.1
1039	ジフテリア菌	TAENTPLPIAGVLLPTIPGK	1922	AAV70486.1
1040	ジフテリア菌	TEPLMEQVGTEEFIKRFGDG	1923	AAV70486.1
1041	ジフテリア菌	TIKKELGLSLTEPLMEQVGT	1924	AAV70486.1
1042	ジフテリア菌	TKVNSKLSLFFEIKS	1925	AAV70486.1
1043	ジフテリア菌	VEDSIIRTGFQGESGHDIKI	1926	AAV70486.1
1044	ジフテリア菌	VELEINFETRGKRGQDAMYE	1927	AAV70486.1
1045	ジフテリア菌	VESIINLFQVVHNSYNRPAY	1928	AAV70486.1
1046	ジフテリア菌	VHNSYNRPAYSPGHKTQPFL	1929	AAV70486.1
1047	ジフテリア菌	VKVTYPGLTKVLALKVDNAE	1930	AAV70486.1
1048	ジフテリア菌	VLALKVDNAETIKKELGLSL	1931	AAV70486.1
1049	ジフテリア菌	VLGYQKTVDHTKVNSKLSLF	1932	AAV70486.1
1050	ジフテリア菌	VRRSVGSSLSCINLDWDVIR	1933	AAV70486.1
1051	ジフテリア菌	WAVNVAQVIDSETADNLEKT	1934	AAV70486.1
1052	ジフテリア菌	YMAQACAGNRVRRSVGSSLS	1935	AAV70486.1
1053	百日咳菌	AKAPPAPKPAPQPGP	1936	ABO77783.1
1054	百日咳菌	APKPAPQPGP	1937	ABO77783.1
1055	百日咳菌	APKPAPQPGPQPPQP	1938	ABO77783.1
1056	麻疹ウイルス株エドモンストン	AQTRTPLQCTMTEIF	1939	P04851.1
1057	麻疹ウイルス株エドモンストン	ASRGTNMEDEADQYFSHDD	1940	P04851.1
1058	百日咳菌	ATIRR	1941	ABO77783.1
1059	百日咳菌	DNRAG	1942	ABO77783.1
1060	百日咳菌	EAPAPQPPAGRELSA	1943	ABO77783.1

【表４２－３６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1061	麻疹ウイルス株エドモンストン	EMVRRSAGKVSSTLASELGI	1944	P04851.1
1062	百日咳菌	GASEL	1945	ABO77783.1
1063	百日咳菌	GDALAGGAVP	1946	AAA22980.1
1064	百日咳菌	GDAPAGGAVP	1947	ABO77783.1
1065	百日咳菌	GDTWDDD	1948	ABO77783.1
1066	百日咳菌	GERQH	1949	ABO77783.1
1067	百日咳菌	GGAVP	1950	ABO77783.1
1068	百日咳菌	GGFGP	1951	P14283.3
1069	百日咳菌	GGFGPGGFGP	1952	BAF35031.1
1070	百日咳菌	GGFGPVLDGW	1953	ABO77783.1
1071	麻疹ウイルス株エドモンストン	GGKEDRRVKQSRGEARESYR	1954	P04851.1
1072	百日咳菌	GILLEN	1955	ABO77783.1
1073	百日咳菌	GIRRFL	1956	ABO77783.1
1074	麻疹ウイルス株エドモンストン	HDDPISSDQSRFGWFENKEI	1957	P04851.1
1075	麻疹ウイルス株エドモンストン	HEFAGELSTLESLMNLY	1958	P04851.1
1076	百日咳菌	HLGGLAGY	1959	ABO77783.1
1077	麻疹ウイルス株エドモンストン	HTTEDKISRAVGPRQAQVSFL	1960	P04851.1
1078	麻疹ウイルス株エドモンストン	ICDIDTYIVEAGLASFILTI	1961	P04851.1
1079	麻疹ウイルス株エドモンストン	IIIVPIPGDSSITTRSRLLD	1962	P04851.1
1080	麻疹ウイルス株エドモンストン	ILDIKRTPGNKPRIAEMICD	1963	P04851.1
1081	百日咳菌	KALLYR	1964	ABO77783.1
1082	麻疹ウイルス株エドモンストン	KPPITSGSGGAIRGIKHIII	1965	P04851.1
1083	百日咳菌	LAGSGL	1966	ABO77783.1
1084	麻疹ウイルス株エドモンストン	LGITAEDARLVSEIAMHTTE	1967	P04851.1
1085	麻疹ウイルス株エドモンストン	LGTILAQIWVLLAKAVTA	1968	P04851.1
1086	麻疹ウイルス株エドモンストン	LPTGTPLDIDTASESSQD	1969	P04851.1
1087	麻疹ウイルス株エドモンストン	MATLLRSLALFKRNKDK	1970	P04851.1
1088	百日咳菌	PAPQPP	1971	ABO77783.1
1089	麻疹ウイルス株エドモンストン	PDTAADSELRRWIKYTQQRR	1972	P04851.1
1090	麻疹ウイルス株エドモ	PKLTGALIGILSLFVESPGQ	1973	P04851.1

【表４２－３７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン			
1091	百日咳菌	PQP	1974	ABO77783.1
1092	百日咳菌	PQPGP	1975	ABO77783.1
1093	百日咳菌	PQPGPQPPQPPQPQP	1976	ABO77783.1
1094	麻疹ウイルス株エドモンストン	QDPQDSRRSAEPLLSCKPWQ	1977	P04851.1
1095	麻疹ウイルス株エドモンストン	QRRVVGEFRLERKWLDVVR	1978	P04851.1
1096	百日咳菌	RELSA	1979	ABO77783.1
1097	百日咳菌	RFAPQ	1980	ABO77783.1
1098	麻疹ウイルス株エドモンストン	SIQNKFSAGSYPLLWSYAMG	1981	P04851.1
1099	百日咳菌	SITLQAGAH	1982	ABO77783.1
1100	百日咳菌	SLQPED	1983	ABO77783.1
1101	百日咳菌	SNALSKRL	1984	ABO77783.1
1102	麻疹ウイルス株エドモンストン	SPGQLIQRITDDPDVSIRLL	1985	P04851.1
1103	百日咳菌	TELPSIPG	1986	ABO77783.1
1104	百日咳菌	TFTLANK	1987	ABO77783.1
1105	百日咳菌	TWDDD	1988	ABO77783.1
1106	麻疹ウイルス株エドモンストン	VSFLQGDQSENELPRLGGKE	1989	P04851.1
1107	麻疹ウイルス株エドモンストン	WQESRKNKAQTRTPLQC	1990	P04851.1
1108	麻疹ウイルス株エドモンストン	YAMGVGVELENSMGGLNFGR	1991	P04851.1
1109	麻疹ウイルス株エドモンストン	YQQMGKPAPYMVNLENSI	1992	P04851.1
1110	麻疹ウイルス株ハレ	MTRSSHQSLVIKLMP	1993	P69355.1
1111	麻疹ウイルス株ハレ	PIRDALNAMTQNIRP	1994	P69355.1
1112	風疹ウイルス株M33	ALLNTPPPYQVSCGGESDRASAGH	1995	CAA28880.1
1113	風疹ウイルス株テリアン	GLGSPNCHGPDWASPVCQRHS	1996	P07566.1
1114	風疹ウイルス株テリアン	GLGSPNCHGPDWASPVCQRHSPDCSRLV	1997	P07566.1
1115	風疹ウイルス株テリアン	NYTGNQQSRWGLGSPNCHGPDWASPV	1998	P07566.1
1116	風疹ウイルス株テリアン	TLPQPPCAHGQHYGHHHHQL	1999	P07566.1
1117	風疹ウイルス株テリアン	TVRVKFHTETRTVWQLSVAGVSCNVT	2000	P07566.1
1118	風疹ウイルス	ASYFNPGGSYYKQYH	2001	BAA28178.1
1119	風疹ウイルス	FALASYVQHPHKTVR	2002	BAA28178.1

【表４２－３８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1120	風疹ウイルス	GGESDRASARVIDPAAQSFTG	2003	BAA28178.1
1121	風疹ウイルス	GPGEVWVTPVIGSQARKC	2004	BAA28178.1
1122	風疹ウイルス	GSQARKCGLHIRAG	2005	BAA28178.1
1123	風疹ウイルス	LVGATPERPRLRLVDADDPLLRTAP	2006	BAA28178.1
1124	風疹ウイルス	TAPGPGEVWVTPVI	2007	BAA28178.1
1125	麻疹モルビリウイルス	FIVLSIAYPTLSEIK	2008	AAL29688.1
1126	麻疹ウイルス株エドモンストン-ザグレブ	ETCFQQACKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSY	2009	P08362.1
1127	麻疹モルビリウイルス	LPRLGGKEDR	2010	P04851.1
1128	麻疹モルビリウイルス	MSKTEWNASQ	2011	SRC280080
1129	麻疹モルビリウイルス	SRFGWFENKE	2012	P04851.1
1130	風疹ウイルス	EACVTSWLWSEGEGAVFYRVDLHFINLGT	2013	CAA28880.1
1131	風疹ウイルス	MDFWCVEHDRPPPATPTSLTT	2014	CAA33016.1
1132	風疹ウイルス	PFLGHDGHHGGTLRVGQHHRNASDV	2015	CAA33016.1
1133	風疹ウイルス	RVKFHTETRTVWQLSVAGVSC	2016	BAA19893.1
1134	麻疹モルビリウイルス	AEEQARHVKNGLE	2017	ABO69699.1
1135	麻疹モルビリウイルス	ESPQEISKHQALG	2018	SRC280080
1136	麻疹モルビリウイルス	GVGVELENSMGGLNF	2019	ABI54110.1
1137	麻疹モルビリウイルス	IKGANDLAKFHQMLMKIIMK	2020	ABO69699.1
1138	麻疹モルビリウイルス	MSKTLHAQLGFKKT	2021	ABK40528.1
1139	麻疹モルビリウイルス	NASGLSRPSPSAH	2022	BAE98296.1
1140	麻疹モルビリウイルス	VRVIDPSLGDRKDE	2023	SRC280148
1141	百日咳菌	DLSDGDLLV	2024	AAC31207.1
1142	百日咳菌	EAERAGRGTG	2025	ACI04548.1
1143	百日咳菌	YRYDSRPPEDV	2026	ACI04548.1
1144	百日咳菌	YVDTYGDNAG	2027	ACI04548.1
1145	麻疹モルビリウイルス	SFSYFYPFR	2028	CAB43772.1
1146	ムンプスルブラウイルス	DIFIVSPR	2029	ADF49557.1
1147	麻疹モルビリウイルス	QDSRRSADALLRLQAMAGISEEQGSDTDTPIVYNDRN	2030	CAA59302.1
1148	麻疹モルビリウイルス	SAEALLRLQA	2031	BAH22350.1
1149	麻疹モルビリウイルス	RIVINREHL	2032	BAB39835.1
1150	麻疹ウイルス遺伝子型 A	IPRFK	2033	BAB39848.1
1151	百日咳菌	AAALSPMEI	2034	P15318.2
1152	百日咳菌	AAASVVGAPV	2035	P15318.2
1153	百日咳菌	AALGRQDSI	2036	P15318.2
1154	百日咳菌	AAQRLVHAIA	2037	P15318.2
1155	百日咳菌	AAVEAAEL	2038	P15318.2

【表４２－３９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1156	百日咳菌	AGANVLNGL	2039	P15318.2
1157	百日咳菌	AGYANAAD	2040	P15318.2
1158	百日咳菌	AGYEQFEFRV	2041	P15318.2
1159	百日咳菌	AITGNADNL	2042	P15318.2
1160	百日咳菌	AKEKNATLM	2043	P15318.2
1161	百日咳菌	AKGVFLSL	2044	P15318.2
1162	百日咳菌	APHEYGFGI	2045	P15318.2
1163	百日咳菌	ARQGNDLEI	2046	P15318.2
1164	百日咳菌	ASVVGAPV	2047	P15318.2
1165	百日咳菌	ATLMFRLV	2048	P15318.2
1166	百日咳菌	AVAAAQRL	2049	P15318.2
1167	百日咳菌	DAGANVLNGL	2050	P15318.2
1168	百日咳菌	DALLAQLYR	2051	P15318.2
1169	百日咳菌	DANGVLKHSI	2052	P15318.2
1170	百日咳菌	DGDMNIGVI	2053	P15318.2
1171	百日咳菌	DHVKNIENL	2054	P15318.2
1172	百日咳菌	DIDMFAIM	2055	P15318.2
1173	百日咳菌	DMFAIMPHL	2056	P15318.2
1174	百日咳菌	DNVRNVENV	2057	P15318.2
1175	百日咳菌	DNVRNVENVI	2058	P15318.2
1176	百日咳菌	DTVDYSAM	2059	P15318.2
1177	百日咳菌	DTVDYSAMI	2060	P15318.2
1178	百日咳菌	DYLRQAGL	2061	P15318.2
1179	百日咳菌	DYYDNVRNV	2062	P15318.2
1180	百日咳菌	EFTTFVEI	2063	P15318.2
1181	百日咳菌	EFTTFVEIV	2064	P15318.2
1182	百日咳菌	EGYVFYEN	2065	P15318.2
1183	百日咳菌	ENVQYRHV	2066	P15318.2
1184	百日咳菌	EQLANSDGL	2067	P15318.2
1185	百日咳菌	FGVGYGHDTI	2068	P15318.2
1186	百日咳菌	FSPDVLETVP	2069	P15318.2
1187	百日咳菌	FSVDHVKNI	2070	P15318.2
1188	百日咳菌	GDDTYLFGV	2071	P15318.2
1189	百日咳菌	GDDVFLQDL	2072	P15318.2
1190	百日咳菌	GEDGNDIFL	2073	P15318.2
1191	百日咳菌	GERFNVRKQL	2074	P15318.2
1192	百日咳菌	GGAGNDTLV	2075	P15318.2
1193	百日咳菌	GGDDFEAV	2076	P15318.2

【表４２－４０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1194	百日咳菌	GKSEFTTFV	2077	P15318.2
1195	百日咳菌	GKSLFDDGL	2078	P15318.2
1196	百日咳菌	GNADNLKSV	2079	P15318.2
1197	百日咳菌	GQLVEVDTL	2080	P15318.2
1198	百日咳菌	GRSKFSPDV	2081	P15318.2
1199	百日咳菌	GSSAYDTV	2082	P15318.2
1200	百日咳菌	GTVEKWPAL	2083	P15318.2
1201	百日咳菌	GVDYYDNV	2084	P15318.2
1202	百日咳菌	GYEQFEFRV	2085	P15318.2
1203	百日咳菌	HAVGAQDVV	2086	P15318.2
1204	百日咳菌	IAAGRIGLGI	2087	P15318.2
1205	百日咳菌	IGDAQANTL	2088	P15318.2
1206	百日咳菌	IGLGILADL	2089	P15318.2
1207	百日咳菌	IGNAAGIPL	2090	P15318.2
1208	百日咳菌	IGTSMKDVL	2091	P15318.2
1209	百日咳菌	IGVITDFEL	2092	P15318.2
1210	百日咳菌	IPLTADIDM	2093	P15318.2
1211	百日咳菌	ISKSALEL	2094	P15318.2
1212	百日咳菌	ITGNADNL	2095	P15318.2
1213	百日咳菌	KIFVVSAT	2096	P15318.2
1214	百日咳菌	KQLNNANVYR	2097	P15318.2
1215	百日咳菌	KVIGNAAGI	2098	P15318.2
1216	百日咳菌	LAKVVSQL	2099	P15318.2
1217	百日咳菌	LANDYARKI	2100	P15318.2
1218	百日咳菌	LDYLRQAGL	2101	P15318.2
1219	百日咳菌	LGKGFASL	2102	P15318.2
1220	百日咳菌	LGKGFASLM	2103	P15318.2
1221	百日咳菌	LGVDYYDN	2104	P15318.2
1222	百日咳菌	LGVDYYDNV	2105	P15318.2
1223	百日咳菌	LKHSIKLDVI	2106	P15318.2
1224	百日咳菌	LQAGYIPV	2107	P15318.2
1225	百日咳菌	LQLTGGTVE	2108	P15318.2
1226	百日咳菌	LSAAVFGL	2109	P15318.2
1227	百日咳菌	LSLGKGFASL	2110	P15318.2
1228	百日咳菌	LSPMEIYGL	2111	P15318.2
1229	百日咳菌	NAHDNFLAGG	2112	P15318.2
1230	百日咳菌	NANVYREGV	2113	P15318.2
1231	百日咳菌	NDTLYGGL	2114	P15318.2

【表４２－４１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1232	百日咳菌	NGLAGNDVL	2115	P15318.2
1233	百日咳菌	NNANVYREGV	2116	P15318.2
1234	百日咳菌	NTVSYAAL	2117	P15318.2
1235	百日咳菌	NVLRNIENAV	2118	P15318.2
1236	百日咳菌	PALTFITPL	2119	P15318.2
1237	百日咳菌	PETSNVLRNI	2120	P15318.2
1238	百日咳菌	PMEIYGLV	2121	P15318.2
1239	百日咳菌	PQAYFEKNL	2122	P15318.2
1240	百日咳菌	PVNPNLSKL	2123	P15318.2
1241	百日咳菌	QAGWNASSV	2124	P15318.2
1242	百日咳菌	QAGWNASSVI	2125	P15318.2
1243	百日咳菌	QDAANAGNL	2126	P15318.2
1244	百日咳菌	QDAANAGNLL	2127	P15318.2
1245	百日咳菌	QDSGYDSL	2128	P15318.2
1246	百日咳菌	QQSHYADQL	2129	P15318.2
1247	百日咳菌	RALQGAQAV	2130	P15318.2
1248	百日咳菌	RGGLGLDTL	2131	P15318.2
1249	百日咳菌	RKQLNNANV	2132	P15318.2
1250	百日咳菌	RQDSGYDSL	2133	P15318.2
1251	百日咳菌	RQFRYDGDM	2134	P15318.2
1252	百日咳菌	RSKFSPDVL	2135	P15318.2
1253	百日咳菌	SAGAAAGAL	2136	P15318.2
1254	百日咳菌	SAHWGQRAL	2137	P15318.2
1255	百日咳菌	SAMIHPGRI	2138	P15318.2
1256	百日咳菌	SAMIHPGRIV	2139	P15318.2
1257	百日咳菌	SAYDTVSGI	2140	P15318.2
1258	百日咳菌	SAYGYEGD	2141	P15318.2
1259	百日咳菌	SGGAGDDVL	2142	P15318.2
1260	百日咳菌	SGLQVAGA	2143	P15318.2
1261	百日咳菌	SGYDSLDGV	2144	P15318.2
1262	百日咳菌	SLLTGALNGI	2145	P15318.2
1263	百日咳菌	SPMEIYGL	2146	P15318.2
1264	百日咳菌	SQMLTRGQL	2147	P15318.2
1265	百日咳菌	SSAYDTVSGI	2148	P15318.2
1266	百日咳菌	SSLAHGHTA	2149	P15318.2
1267	百日咳菌	SSVTSGDSV	2150	P15318.2
1268	百日咳菌	SVIGVQTTEI	2151	P15318.2
1269	百日咳菌	TNTVSYAAL	2152	P15318.2

【表４２－４２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1270	百日咳菌	TSLIAEGV	2153	P15318.2
1271	百日咳菌	TSLLTGAL	2154	P15318.2
1272	百日咳菌	TVPASPGL	2155	P15318.2
1273	百日咳菌	VAKEKNATL	2156	P15318.2
1274	百日咳菌	VAPHEYGFGI	2157	P15318.2
1275	百日咳菌	VAVVTSLL	2158	P15318.2
1276	百日咳菌	VFYENRAYG	2159	P15318.2
1277	百日咳菌	VFYENRAYGV	2160	P15318.2
1278	百日咳菌	VITDFELEV	2161	P15318.2
1279	百日咳菌	VNPHSTSL	2162	P15318.2
1280	百日咳菌	VNPHSTSLI	2163	P15318.2
1281	百日咳菌	VNPNLSKL	2164	P15318.2
1282	百日咳菌	VNPNLSKLF	2165	P15318.2
1283	百日咳菌	VQQPIIEKL	2166	P15318.2
1284	百日咳菌	VQYRHVEL	2167	P15318.2
1285	百日咳菌	VSIAAAASV	2168	P15318.2
1286	百日咳菌	VSIAAAASVV	2169	P15318.2
1287	百日咳菌	VTSLLTGAL	2170	P15318.2
1288	百日咳菌	VVLANASRI	2171	P15318.2
1289	百日咳菌	WPALNLFSV	2172	P15318.2
1290	百日咳菌	WVRKASAL	2173	P15318.2
1291	百日咳菌	YAVQYRRKGG	2174	P15318.2
1292	百日咳菌	YGGLGDDTL	2175	P15318.2
1293	百日咳菌	YGLVQQSHYA	2176	P15318.2
1294	百日咳菌	YGYEGDALL	2177	P15318.2
1295	百日咳菌	YIPVNPNL	2178	P15318.2
1296	百日咳菌	YSAMIHPGRI	2179	P15318.2
1297	百日咳菌	YSQTGAHAGI	2180	P15318.2
1298	ジフテリア菌	AYNFVESIINLFQVVHNSYN	2181	CAE11230.1
1299	百日咳菌	SGTTIK	2182	BAF35031.1
1300	百日咳菌	RGHTLESAEGRKIFG	2183	AAA22974.1
1301	百日咳菌	AGAMTVRDVAAAADLALQAGDA	2184	AAA22974.1
1302	百日咳菌	AGAMTVRDVAAAADLALQAGDAL	2185	AAA22974.1
1303	百日咳菌	ALAAVLVNPHIFTRIGAAQTSLADGAAGPA	2186	AAA22974.1
1304	百日咳菌	ALSIDSMTALGA	2187	AAA22974.1
1305	百日咳菌	DLSAARGADISGEGR	2188	AAA22974.1
1306	百日咳菌	DQNRYEYIWGLY	2189	AAA22974.1
1307	百日咳菌	DYTVSADAIALA	2190	AAA22974.1

【表４２－４３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1308	百日咳菌	GPIVVEAGELVSHAGG	2191	AAA22974.1
1309	百日咳菌	GRPEGLKIGAHSATSVSGSFDAL	2192	AAA22974.1
1310	百日咳菌	ITVTSRGGFDNEGKMESNK	2193	AAA22974.1
1311	百日咳菌	LDQNRYEYIWGLYP	2194	AAA22974.1
1312	百日咳菌	LSAARGADISG	2195	AAA22974.1
1313	百日咳菌	NKIRLMGPLQ	2196	AAA22974.1
1314	百日咳菌	NKLGRIRAGEDM	2197	AAA22974.1
1315	百日咳菌	NKLGRIRAGEDMHLDAPRIE	2198	AAA22974.1
1316	百日咳菌	PHLRNTGQVVAG	2199	AAA22974.1
1317	百日咳菌	QVDLHDLSAARGADISG	2200	AAA22974.1
1318	百日咳菌	RDVAAAADLALQ	2201	AAA22974.1
1319	百日咳菌	SAARGADISGEG	2202	AAA22974.1
1320	百日咳菌	TKGEMQIAGKGGGSP	2203	AAA22974.1
1321	百日咳菌	TVSADAIALAAQ	2204	AAA22974.1
1322	百日咳菌	VVAGHDIHI	2205	AAA22974.1
1323	百日咳菌	PSGPNHTKVVQLPKISKNALKANG	2206	CAD12823.1
1324	風疹ウイルス	LVGATPERPRLRLVDADDPLLRTAPGPGEVWVT PVIGSQAR	2207	BAA19902.1
1325	風疹ウイルス	QQSRWGLGSPNCHGPDWASPVCQRHSP	2208	BAA19902.1
1326	百日咳菌	AGEAMVLVYYESIAYSF	2209	ACI04548.1
1327	百日咳菌	GGVGLASTLWYAESNALSKRLGEL	2210	AAZ74322.1
1328	百日咳菌	GTLVRIAPVIGACMARQA	2211	ACI04548.1
1329	百日咳菌	IRRVTRVYHNGITGETTT	2212	ACI04548.1
1330	百日咳菌	IVKTGERQHGIHIQGSDP	2213	AAZ74322.1
1331	百日咳菌	IVKTGERQHGIHIQGSDPGGVRTA	2214	AAZ74338.1
1332	百日咳菌	LRDTNVTAVPASGAPAAVSVLGAS	2215	AAZ74338.1
1333	百日咳菌	PEAPAPQPPAGRELSAAANAAVNT	2216	AAZ74322.1
1334	百日咳菌	AAADFAHAE	2217	WP_019247158.1
1335	百日咳菌	AAAEVAGAL	2218	WP_019249248.1
1336	百日咳菌	AAESTFESY	2219	WP_019247158.1
1337	百日咳菌	AAGFDPEVQ	2220	WP_019248145.1
1338	百日咳菌	AALGRGHSL	2221	AGS56996.1
1339	百日咳菌	AAMQGAVVH	2222	AGT50936.1
1340	百日咳菌	AAPAAHADW	2223	AGS56996.1
1341	百日咳菌	AAQATVVQR	2224	WP_019247158.1
1342	百日咳菌	AARVAGDNY	2225	WP_0192492

【表４２－４４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				48.1
1343	百日咳菌	AAVALLNKL	2226	WP_019249248.1
1344	百日咳菌	ADDPPATVY	2227	AAW72734.1
1345	百日咳菌	AEAGRFKVL	2228	AGS56996.1
1346	百日咳菌	AEATQLVTA	2229	WP_019247158.1
1347	百日咳菌	AEGGATLGA	2230	WP_019249248.1
1348	百日咳菌	AEHGEVSIQ	2231	WP_019249248.1
1349	百日咳菌	AEIAFYPKE	2232	WP_019249248.1
1350	百日咳菌	AEKVTTPAV	2233	WP_019247158.1
1351	百日咳菌	AELQTYLRQ	2234	1BCP_C
1352	百日咳菌	AEQSLIEVG	2235	WP_019249248.1
1353	百日咳菌	AESNALSKR	2236	AGS56996.1
1354	百日咳菌	AESSEAMAA	2237	AFK26302.1
1355	百日咳菌	AEVKVGYRA	2238	WP_019247158.1
1356	百日咳菌	AEVTDTSPS	2239	WP_019249248.1
1357	百日咳菌	AGKSLKKKN	2240	WP_019247158.1
1358	百日咳菌	AGLAGPSAV	2241	WP_019249248.1
1359	百日咳菌	AIRVGRGAR	2242	AGT50936.1
1360	百日咳菌	ALAAIASAA	2243	WP_019248145.1
1361	百日咳菌	ALADVPYVL	2244	AAA22983.1
1362	百日咳菌	ALANDGTIV	2245	WP_019248658.1
1363	百日咳菌	ALGRGHSLY	2246	AGS56996.1
1364	百日咳菌	ALILAASPV	2247	WP_019248658.1
1365	百日咳菌	ALMLACTGL	2248	AAA22974.1
1366	百日咳菌	AMQGAVVHL	2249	AGT50936.1
1367	百日咳菌	AMTHLSPAL	2250	AAA22983.1
1368	百日咳菌	AMYGKHITL	2251	WP_019249248.1
1369	百日咳菌	ANEANALLW	2252	WP_019249248.1

【表４２－４５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1370	百日咳菌	APLSITLQA	2253	AGT50936.1
1371	百日咳菌	APNALAWAL	2254	AAA22974.1
1372	百日咳菌	APPAPKPAP	2255	AGS56996.1
1373	百日咳菌	APPGAGFIY	2256	1BCP_C
1374	百日咳菌	APQAAPLSI	2257	AGT50936.1
1375	百日咳菌	APRIENTAK	2258	WP_019249248.1
1376	百日咳菌	AQGKALLYR	2259	AGT50936.1
1377	百日咳菌	AQITSYVGF	2260	WP_019248658.1
1378	百日咳菌	AQLEVRGQR	2261	WP_019249248.1
1379	百日咳菌	AQQLKQADR	2262	WP_019247699.1
1380	百日咳菌	AQVTVAGRY	2263	WP_019249248.1
1381	百日咳菌	ARRSRVRAL	2264	NP_882284.1
1382	百日咳菌	ASPRRARRA	2265	WP_019249248.1
1383	百日咳菌	ASSPDAHVP	2266	AAA22983.1
1384	百日咳菌	ASVSNPGTF	2267	WP_019249248.1
1385	百日咳菌	ATWNFQSTY	2268	WP_019249248.1
1386	百日咳菌	ATYIADSGF	2269	AGS56996.1
1387	百日咳菌	AVAAPAVGA	2270	WP_019249248.1
1388	百日咳菌	AVFMQQRPL	2271	AAA22983.1
1389	百日咳菌	AVLVNPHIF	2272	WP_019249248.1
1390	百日咳菌	CFGKDLKRP	2273	AAA22983.1
1391	百日咳菌	CPSSLGNGV	2274	WP_019248145.1
1392	百日咳菌	DAGHEHDTW	2275	AAA22984.1
1393	百日咳菌	DAKHDLTVT	2276	WP_019249248.1
1394	百日咳菌	DASGQHRLW	2277	AGS56996.1
1395	百日咳菌	DATFETYAL	2278	YP_006628018.1
1396	百日咳菌	DATFQTYAL	2279	1BCP_C
1397	百日咳菌	DATLVGAKF	2280	WP_019247158.1
1398	百日咳菌	DDEVDVSGR	2281	AAA22974.1
1399	百日咳菌	DENGKPQTY	2282	WP_0192471

【表４２－４６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				58.1
1400	百日咳菌	DGPPSRPTT	2283	WP_019247158.1
1401	百日咳菌	DHLTGRSCQ	2284	AAW72734.1
1402	百日咳菌	DNEGKMESN	2285	WP_019249248.1
1403	百日咳菌	DPPATVYRY	2286	AAW72734.1
1404	百日咳菌	EATEGDATL	2287	WP_019247158.1
1405	百日咳菌	EATQQAAGF	2288	WP_019248145.1
1406	百日咳菌	ECSGKQDCP	2289	AAA22983.1
1407	百日咳菌	EGGKLRGKD	2290	AAA22974.1
1408	百日咳菌	EGKMESNKD	2291	WP_019249248.1
1409	百日咳菌	EHRMQEAVE	2292	AAW72734.1
1410	百日咳菌	EKRLDIDDA	2293	WP_019249248.1
1411	百日咳菌	EPASANTLL	2294	AGS56996.1
1412	百日咳菌	EPQAELAVF	2295	AGS56996.1
1413	百日咳菌	EPVKLTLTG	2296	AGT50936.1
1414	百日咳菌	ESAEGRKIF	2297	WP_019249248.1
1415	百日咳菌	ESYSESHNF	2298	WP_019247158.1
1416	百日咳菌	ETFCITTIY	2299	1BCP_C
1417	百日咳菌	EVAGALELS	2300	WP_019249248.1
1418	百日咳菌	EVAKVEVVP	2301	WP_019247158.1
1419	百日咳菌	EVDGIIQEF	2302	WP_019249248.1
1420	百日咳菌	EVRADNNFY	2303	WP_019248344.1
1421	百日咳菌	FAILSSTTE	2304	WP_019247158.1
1422	百日咳菌	FAISAYALK	2305	AAA22984.1
1423	百日咳菌	FALYDGTYL	2306	AFK26303.1
1424	百日咳菌	FDTMLGFAI	2307	AAA22984.1
1425	百日咳菌	FEGKPALEL	2308	AAA22983.1
1426	百日咳菌	FELGADHAV	2309	AGS56996.1

【表４２－４７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1427	百日咳菌	FEPGITTNY	2310	WP_019248658.1
1428	百日咳菌	FETYALTGI	2311	YP_006628018.1
1429	百日咳菌	FIYRETFCI	2312	1BCP_C
1430	百日咳菌	FPTRTTAPG	2313	NP_882284.1
1431	百日咳菌	FQTYALTGI	2314	1BCP_C
1432	百日咳菌	FTHADGWFL	2315	AGS56996.1
1433	百日咳菌	FVRDGQSVI	2316	1BCP_C
1434	百日咳菌	FVRSGQPVI	2317	YP_006628018.1
1435	百日咳菌	FVWYVDTVI	2318	WP_019248866.1
1436	百日咳菌	GAASSRQAL	2319	WP_019249248.1
1437	百日咳菌	GAASSYFEY	2320	AAW72734.1
1438	百日咳菌	GAFDLKTTF	2321	AFK26303.1
1439	百日咳菌	GAPAAVSVL	2322	AGS56996.1
1440	百日咳菌	GATRAVDSL	2323	AGS56996.1
1441	百日咳菌	GAVPGGAVP	2324	AGT50936.1
1442	百日咳菌	GEAMVLVYY	2325	AFK26302.1
1443	百日咳菌	GEIALGDAT	2326	WP_019249248.1
1444	百日咳菌	GELMAAQVA	2327	WP_019247158.1
1445	百日咳菌	GGVPGGAVP	2328	AAZ74338.1
1446	百日咳菌	GHEHDTWFD	2329	AAA22984.1
1447	百日咳菌	GIGALKAGA	2330	WP_019249248.1
1448	百日咳菌	GIVIPPKAL	2331	1BCP_C
1449	百日咳菌	GKDLKRPGS	2332	AAA22983.1
1450	百日咳菌	GKLPKPVTV	2333	WP_019247158.1
1451	百日咳菌	GKSLKKKNQ	2334	WP_019247158.1
1452	百日咳菌	GLDVQQGTV	2335	WP_019249248.1
1453	百日咳菌	GLTDGVSRI	2336	WP_019249248.1
1454	百日咳菌	GLYPTYTEW	2337	WP_019249248.1
1455	百日咳菌	GLYQTYTEW	2338	YP_006626470.1

【表４２－４８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1456	百日咳菌	GPPSRPTTP	2339	WP_019247158.1
1457	百日咳菌	GPSAVAAPA	2340	WP_019249248.1
1458	百日咳菌	GVAPTAQQL	2341	WP_019248866.1
1459	百日咳菌	GVGLASTLW	2342	AGS56996.1
1460	百日咳菌	GYEAGFSLG	2343	WP_019247158.1
1461	百日咳菌	HADDGTIVI	2344	WP_019248145.1
1462	百日咳菌	HADWNNQSI	2345	AGS56996.1
1463	百日咳菌	HAEHEKDVR	2346	WP_019247158.1
1464	百日咳菌	HANHYGTRI	2347	WP_019247158.1
1465	百日咳菌	HAQGKALLY	2348	AGT50936.1
1466	百日咳菌	HFIGYIYEV	2349	AAW72734.1
1467	百日咳菌	HLSPALADV	2350	AAA22983.1
1468	百日咳菌	HSLYASYEY	2351	AGS56996.1
1469	百日咳菌	HVRGMLVPV	2352	AAA22974.1
1470	百日咳菌	HVSKEEQYY	2353	YP_006628018.1
1471	百日咳菌	HVTRGWSIF	2354	AFK26303.1
1472	百日咳菌	IADSGFYLD	2355	AGS56996.1
1473	百日咳菌	IAHRTELRG	2356	AGS56996.1
1474	百日咳菌	IENTAKLSG	2357	WP_019249248.1
1475	百日咳菌	IESKISQSV	2358	WP_019249248.1
1476	百日咳菌	IETGGARRF	2359	AGT50936.1
1477	百日咳菌	IIKDAPPGA	2360	1BCP_C
1478	百日咳菌	IIQEFAADL	2361	WP_019249248.1
1479	百日咳菌	ILAGALATY	2362	AAW72734.1
1480	百日咳菌	ILLENPAAE	2363	AGS56996.1
1481	百日咳菌	ILPILVLAL	2364	NP_882286.1
1482	百日咳菌	IPFQRALRL	2365	WP_019248145.1
1483	百日咳菌	ISVRVHVSK	2366	YP_006628018.1
1484	百日咳菌	ITNETGKTY	2367	WP_019247

【表４２－４９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				58.1
1485	百日咳菌	ITNKRAALI	2368	WP_019249248.1
1486	百日咳菌	ITSYVGFSV	2369	WP_019248658.1
1487	百日咳菌	ITVTSRGGF	2370	WP_019249248.1
1488	百日咳菌	IVIPPKALF	2371	1BCP_C
1489	百日咳菌	IVVEAGELV	2372	WP_019249248.1
1490	百日咳菌	KAAKSVNLM	2373	WP_019247158.1
1491	百日咳菌	KAAPLRRTT	2374	AGS56996.1
1492	百日咳菌	KAGKLSATG	2375	WP_019249248.1
1493	百日咳菌	KAGTIAAPW	2376	WP_019249248.1
1494	百日咳菌	KAKSLTTEI	2377	WP_019249248.1
1495	百日咳菌	KATVTTVQV	2378	WP_019247158.1
1496	百日咳菌	KDYRDKDGG	2379	WP_019247158.1
1497	百日咳菌	KEAATIVAA	2380	WP_019249248.1
1498	百日咳菌	KEDVDAAQI	2381	WP_019248658.1
1499	百日咳菌	KEVDGIIQE	2382	WP_019249248.1
1500	百日咳菌	KGPKLAMPW	2383	AGS56996.1
1501	百日咳菌	KLASGGGAV	2384	WP_019249248.1
1502	百日咳菌	KLKGKNQEF	2385	AAA22984.1
1503	百日咳菌	KLLHHILPI	2386	NP_882286.1
1504	百日咳菌	KPAPQPGPQ	2387	AGS56996.1
1505	百日咳菌	KPAPTAPPM	2388	WP_019249248.1
1506	百日咳菌	KPAVSVKVA	2389	WP_019249248.1
1507	百日咳菌	KPDRAARVA	2390	WP_019249248.1
1508	百日咳菌	KPLADIAVI	2391	YP_006626470.1
1509	百日咳菌	KPLADIAVV	2392	WP_019249248.1

【表４２－５０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1510	百日咳菌	KPLPKPLPV	2393	WP_019247158.1
1511	百日咳菌	KQADRDFVW	2394	WP_019247699.1
1512	百日咳菌	KSLPGGKLP	2395	WP_019247158.1
1513	百日咳菌	KSYTLRYLA	2396	WP_019248658.1
1514	百日咳菌	KTNMVVTSV	2397	AAA22983.1
1515	百日咳菌	KVLAPRLYL	2398	AAA22974.1
1516	百日咳菌	KVLSTKTTL	2399	WP_019247158.1
1517	百日咳菌	LAAGAGLTL	2400	WP_019249248.1
1518	百日咳菌	LAAIASAAH	2401	WP_019248145.1
1519	百日咳菌	LAANGNGQW	2402	AGS56996.1
1520	百日咳菌	LAAQVTQRG	2403	WP_019249248.1
1521	百日咳菌	LAARGDGAL	2404	AAA22974.1
1522	百日咳菌	LAAVLVNPH	2405	WP_019249248.1
1523	百日咳菌	LAGSGLFRM	2406	AGS56996.1
1524	百日咳菌	LAKALSAAL	2407	WP_019249248.1
1525	百日咳菌	LALQAGDAL	2408	WP_019249248.1
1526	百日咳菌	LAMPWTFHA	2409	AGS56996.1
1527	百日咳菌	LANDGTIVI	2410	WP_019248658.1
1528	百日咳菌	LAPTVGVAF	2411	WP_019247158.1
1529	百日咳菌	LASDGSVDF	2412	AGS56996.1
1530	百日咳菌	LATYQSEYL	2413	AAW72734.1
1531	百日咳菌	LAWALMLAC	2414	AAA22974.1
1532	百日咳菌	LEAGRRFTH	2415	AGS56996.1
1533	百日咳菌	LFTQQGGAY	2416	1BCP_C
1534	百日咳菌	LKRPGSSPM	2417	AAA22983.1
1535	百日咳菌	LLGSHVARA	2418	AFK26303.1
1536	百日咳菌	LLHHILPIL	2419	NP_882286.1
1537	百日咳菌	LLNAGGTLL	2420	WP_019249248.1
1538	百日咳菌	LMGPLQVNA	2421	WP_019249248

【表４２－５１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				48.1
1539	百日咳菌	LNDSKITMG	2422	WP_019248145.1
1540	百日咳菌	LPEPVKLTL	2423	AGT50936.1
1541	百日咳菌	LPILVLALL	2424	NP_882286.1
1542	百日咳菌	LPKISKNAL	2425	WP_019248145.1
1543	百日咳菌	LPKPVTVKL	2426	WP_019247158.1
1544	百日咳菌	LPLKANPMH	2427	NP_882285.1
1545	百日咳菌	LPPRPVVAE	2428	WP_019247158.1
1546	百日咳菌	LPSIPGTSI	2429	AGS56996.1
1547	百日咳菌	LPTHLYKNF	2430	AAA22984.1
1548	百日咳菌	LPVRGVALV	2431	WP_019249248.1
1549	百日咳菌	LPVSLTALD	2432	WP_019249248.1
1550	百日咳菌	LQGGNKVPV	2433	WP_019249248.1
1551	百日咳菌	LSAALGADW	2434	WP_019249248.1
1552	百日咳菌	LSDAGHEHD	2435	AAA22984.1
1553	百日咳菌	LSGEVQRKG	2436	WP_019249248.1
1554	百日咳菌	LSSPSAITV	2437	WP_019249248.1
1555	百日咳菌	LTWLAILAV	2438	AAW72734.1
1556	百日咳菌	LVFSHVRGM	2439	AAA22974.1
1557	百日咳菌	LVSDAGADL	2440	WP_019249248.1
1558	百日咳菌	LVYYESIAY	2441	AFK26302.1
1559	百日咳菌	MAAESTFES	2442	WP_019247158.1
1560	百日咳菌	MAAGHDATL	2443	WP_019249248.1
1561	百日咳菌	MAAWSERAG	2444	AFK26302.1
1562	百日咳菌	MALGALGAA	2445	AGS56996.1
1563	百日咳菌	MAPVMGACM	2446	ADA85123.1
1564	百日咳菌	MATKGEMQI	2447	WP_019249248.1
1565	百日咳菌	MDAKGGTLL	2448	WP_019249248.1

【表４２－５２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1566	百日咳菌	MESNKDIVI	2449	WP_019249248.1
1567	百日咳菌	MEVMLRAVF	2450	AAA22983.1
1568	百日咳菌	MEYFKTPLP	2451	WP_019249248.1
1569	百日咳菌	MHTIASILL	2452	AAA22984.1
1570	百日咳菌	MIYMSGLAV	2453	1BCP_C
1571	百日咳菌	MLACTGLPL	2454	AAA22974.1
1572	百日咳菌	MPIDRKTLC	2455	AFK26303.1
1573	百日咳菌	MPKAPELDL	2456	WP_019249248.1
1574	百日咳菌	MQRQAGLPL	2457	NP_882285.1
1575	百日咳菌	NALAWALML	2458	AAA22974.1
1576	百日咳菌	NITNKRAAL	2459	WP_019249248.1
1577	百日咳菌	NLMAAESTF	2460	WP_019247158.1
1578	百日咳菌	NNETMSGRQ	2461	WP_019249248.1
1579	百日咳菌	NPGSLIAEV	2462	WP_019249248.1
1580	百日咳菌	NPMHTIASI	2463	NP_882285.1
1581	百日咳菌	NPQTQLSNI	2464	WP_019248145.1
1582	百日咳菌	NPYTSRRSV	2465	AFK26302.1
1583	百日咳菌	PAPTAPPMP	2466	WP_019249248.1
1584	百日咳菌	PASANTLLL	2467	AGS56996.1
1585	百日咳菌	PAVALPRPL	2468	WP_019249248.1
1586	百日咳菌	PDAHVPFCF	2469	AAA22983.1
1587	百日咳菌	PELGAAIRV	2470	AGT50936.1
1588	百日咳菌	PFIIKLKDC	2471	WP_019248145.1
1589	百日咳菌	PGPQPPQPP	2472	AGS56996.1
1590	百日咳菌	PGPQPPQPQ	2473	AAZ74338.1
1591	百日咳菌	PGPTTDYST	2474	WP_019248145.1
1592	百日咳菌	PGTFTAGKD	2475	WP_019249248.1
1593	百日咳菌	PGTPGDLLE	2476	AAA22984.1
1594	百日咳菌	PKPKPKAER	2477	WP_019247158.1
1595	百日咳菌	PKPKPKPKA	2478	WP_019247

【表４２－５３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				58.1
1596	百日咳菌	PKPKPKPKP	2479	WP_019247158.1
1597	百日咳菌	PLPPRPVVA	2480	WP_019247158.1
1598	百日咳菌	PPAPKPAPQ	2481	AGS56996.1
1599	百日咳菌	PPKPAPVAK	2482	WP_019247158.1
1600	百日咳菌	PPRPVAAQV	2483	WP_019247158.1
1601	百日咳菌	PPRPVVAEK	2484	WP_019247158.1
1602	百日咳菌	PPSRPTTPP	2485	WP_019247158.1
1603	百日咳菌	PRRARRALR	2486	WP_019249248.1
1604	百日咳菌	QAAPLSITL	2487	AGT50936.1
1605	百日咳菌	QADRDFVWY	2488	WP_019247699.1
1606	百日咳菌	QAIVVGKDL	2489	WP_019249248.1
1607	百日咳菌	QALGALKLY	2490	ACI16088.1
1608	百日咳菌	QELALKLKG	2491	AAA22984.1
1609	百日咳菌	QITQHGGPY	2492	NP_882283.1
1610	百日咳菌	QITQHGSPY	2493	AFK26303.1
1611	百日咳菌	QPLPPRPVA	2494	WP_019247158.1
1612	百日咳菌	QPPAGRELS	2495	AGS56996.1
1613	百日咳菌	QQLKQADRD	2496	WP_019247699.1
1614	百日咳菌	QQVQVLQRQ	2497	WP_019247158.1
1615	百日咳菌	QSIVEAPEL	2498	AGT50936.1
1616	百日咳菌	QVGSSNSAF	2499	AAW72734.1
1617	百日咳菌	RAGLSPATW	2500	WP_019249248.1
1618	百日咳菌	RARRALRQD	2501	WP_019249248.1
1619	百日咳菌	RASASRARI	2502	WP_019249248.1
1620	百日咳菌	RELSAAANA	2503	AGS56996.1
1621	百日咳菌	RETFCITTI	2504	1BCP_C
1622	百日咳菌	RGFAQRQQL	2505	AGS56996.1

【表４２－５４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1623	百日咳菌	RGSAATFTL	2506	WP_019248295.1
1624	百日咳菌	RGWSIFALY	2507	AFK26303.1
1625	百日咳菌	RKMLYLIYV	2508	YP_006628018.1
1626	百日咳菌	RLRKMLYLI	2509	YP_006628018.1
1627	百日咳菌	RPQITDAVT	2510	WP_019249248.1
1628	百日咳菌	RPSVNGGRI	2511	WP_019249248.1
1629	百日咳菌	RRFTHADGW	2512	AGS56996.1
1630	百日咳菌	RSGARATSL	2513	AAA22974.1
1631	百日咳菌	RSRVRALAW	2514	NP_882284.1
1632	百日咳菌	RSRVRALSW	2515	YP_006628019.1
1633	百日咳菌	RTHGVGASL	2516	AGS56996.1
1634	百日咳菌	RTRGQARSG	2517	AAA22974.1
1635	百日咳菌	RVAPPAVAL	2518	WP_019249248.1
1636	百日咳菌	RVLPEPVKL	2519	AGT50936.1
1637	百日咳菌	RVRALAWLL	2520	NP_882284.1
1638	百日咳菌	RVRALSWLL	2521	YP_006628019.1
1639	百日咳菌	RVTVSGGSL	2522	AGT50936.1
1640	百日咳菌	SEAMAAWSE	2523	AFK26302.1
1641	百日咳菌	SESHNFHAS	2524	WP_019247158.1
1642	百日咳菌	SGEGRVNIG	2525	WP_019249248.1
1643	百日咳菌	SGLAVRVHV	2526	1BCP_C
1644	百日咳菌	SLADISLGA	2527	WP_019249248.1
1645	百日咳菌	SLFAILSST	2528	WP_019247158.1
1646	百日咳菌	SLFAPHGNV	2529	AAZ74338.1
1647	百日咳菌	SLSIDNATW	2530	AGS56996.1
1648	百日咳菌	SPMEVMLRA	2531	AAA22983.1
1649	百日咳菌	SPQPIRATV	2532	WP_019247158.1
1650	百日咳菌	SPRRARRAL	2533	WP_019249248.1
1651	百日咳菌	SPSRLAGTL	2534	WP_019249248.1

【表４２－５５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1652	百日咳菌	SSTPLGSLF	2535	WP_019247158.1
1653	百日咳菌	STYELLDYL	2536	WP_019249248.1
1654	百日咳菌	SVAMKPYEV	2537	AAA22983.1
1655	百日咳菌	SVAPNALAW	2538	AAA22974.1
1656	百日咳菌	SVKVAKKLF	2539	WP_019249248.1
1657	百日咳菌	TAFMSGRSL	2540	AAA22984.1
1658	百日咳菌	TAGATPFDI	2541	WP_019248658.1
1659	百日咳菌	TAPVTSPAW	2542	AAW72734.1
1660	百日咳菌	TARTGWLTW	2543	AAW72734.1
1661	百日咳菌	TEAQGVQVR	2544	WP_019248145.1
1662	百日咳菌	TEVYLEHRM	2545	AAW72734.1
1663	百日咳菌	TFEGKPALE	2546	AAA22983.1
1664	百日咳菌	TFTGKVTNG	2547	WP_019248658.1
1665	百日咳菌	TGDGGGHTD	2548	AGS56996.1
1666	百日咳菌	TLAKALSAA	2549	WP_019249248.1
1667	百日咳菌	TLANVGDTW	2550	AGS56996.1
1668	百日咳菌	TLNASNLTL	2551	WP_019249248.1
1669	百日咳菌	TLSSAHGNV	2552	WP_019249248.1
1670	百日咳菌	TPFDIKLKE	2553	WP_019248658.1
1671	百日咳菌	TPFIIKLKD	2554	WP_019248145.1
1672	百日咳菌	TPGWSIYGL	2555	1BCP_C
1673	百日咳菌	TPLGSAATF	2556	AGS56996.1
1674	百日咳菌	TPLGSLFAI	2557	WP_019247158.1
1675	百日咳菌	TPLPVSLTA	2558	WP_019249248.1
1676	百日咳菌	TRQGIMDQY	2559	YP_006626873.1
1677	百日咳菌	TSKQDERNY	2560	WP_019247158.1
1678	百日咳菌	TSPYDGKYW	2561	YP_0066280

【表４２－５６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
				18.1
1679	百日咳菌	TSRRSVASI	2562	AFK26302.1
1680	百日咳菌	TSRTVTMRY	2563	NP_879898.1
1681	百日咳菌	TTEYPNARY	2564	ADA85123.1
1682	百日咳菌	TTEYSNARY	2565	AFK26302.1
1683	百日咳菌	TTLGLEQTF	2566	WP_019247158.1
1684	百日咳菌	TVLAAGAGL	2567	WP_019249248.1
1685	百日咳菌	TVQELALKL	2568	AAA22984.1
1686	百日咳菌	TVVQRNKHW	2569	WP_019247158.1
1687	百日咳菌	VAAAADLAL	2570	WP_019249248.1
1688	百日咳菌	VALASQARW	2571	AGS56996.1
1689	百日咳菌	VAMKPYEVT	2572	AAA22983.1
1690	百日咳菌	VARLVKLQG	2573	WP_019249248.1
1691	百日咳菌	VAVAGGRWH	2574	AGS56996.1
1692	百日咳菌	VEASAITTY	2575	WP_019248145.1
1693	百日咳菌	VEDIGGKNY	2576	WP_019247158.1
1694	百日咳菌	VEVSSPPPV	2577	WP_019247158.1
1695	百日咳菌	VGAGGYEAG	2578	WP_019247158.1
1696	百日咳菌	VGGGEHGRW	2579	WP_019249248.1
1697	百日咳菌	VHVSKEEQY	2580	YP_006628018.1
1698	百日咳菌	VIDGQKVLA	2581	AAA22974.1
1699	百日咳菌	VIGACTSPY	2582	YP_006628018.1
1700	百日咳菌	VKLGGVYEA	2583	AAA22974.1
1701	百日咳菌	VLAPRLYLT	2584	AAA22974.1
1702	百日咳菌	VLVKTNMVV	2585	AAA22983.1
1703	百日咳菌	VPASGAPAA	2586	AGS56996.1
1704	百日咳菌	VPFCFGKDL	2587	AAA22983.1
1705	百日咳菌	VPVSEHCTV	2588	AAA22974.1
1706	百日咳菌	VPVTPPKVE	2589	WP_019247158.1
1707	百日咳菌	VRTVSAMEY	2590	WP_019249248.1

【表４２－５７】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1708	百日咳菌	VSGGSLSAP	2591	AGT50936.1
1709	百日咳菌	VSSATKAKG	2592	WP_019248658.1
1710	百日咳菌	VSSPPPVSV	2593	WP_019247158.1
1711	百日咳菌	VSVKVAKKL	2594	WP_019249248.1
1712	百日咳菌	VTMRYLASY	2595	WP_019248145.1
1713	百日咳菌	VTSVAMKPY	2596	AAA22983.1
1714	百日咳菌	VVAEKVTTP	2597	WP_019247158.1
1715	百日咳菌	VVDGPPSRP	2598	WP_019247158.1
1716	百日咳菌	VVETAQPLP	2599	WP_019247158.1
1717	百日咳菌	WLTWLAILA	2600	AAW72734.1
1718	百日咳菌	WTFHAGYRY	2601	AGS56996.1
1719	百日咳菌	WVMTDNSNV	2602	AGS56996.1
1720	百日咳菌	YAEHGEVSI	2603	WP_019249248.1
1721	百日咳菌	YAIDGTAAG	2604	WP_019249248.1
1722	百日咳菌	YALKSRIAL	2605	AAA22984.1
1723	百日咳菌	YATNPQTQL	2606	WP_019248145.1
1724	百日咳菌	YDTGDLIAY	2607	WP_019248658.1
1725	百日咳菌	YEAGFSLGS	2608	WP_019247158.1
1726	百日咳菌	YEDATFETY	2609	YP_006628018.1
1727	百日咳菌	YENKSSTPL	2610	WP_019247158.1
1728	百日咳菌	YEVTPTRML	2611	AAA22983.1
1729	百日咳菌	YEYIWGLYP	2612	WP_019249248.1
1730	百日咳菌	YEYIWGLYQ	2613	YP_006626470.1
1731	百日咳菌	YEYSKGPKL	2614	AGS56996.1
1732	百日咳菌	YFEPGPTTD	2615	WP_019248145.1
1733	百日咳菌	YIWGLYPTY	2616	WP_019249248.1

【表４２－５８】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1734	百日咳菌	YIWGLYQTY	2617	YP_006626470.1
1735	百日咳菌	YLRQITPGW	2618	1BCP_C
1736	百日咳菌	YMIYMSGLA	2619	1BCP_C
1737	百日咳菌	YPALRAALI	2620	WP_019248658.1
1738	百日咳菌	YPGTPGDLL	2621	AAA22984.1
1739	百日咳菌	YPTYTEWSV	2622	WP_019249248.1
1740	百日咳菌	YQTYTEWSV	2623	YP_006626470.1
1741	百日咳菌	YSTGDLRAY	2624	WP_019248145.1
1742	百日咳菌	YTLRYLASY	2625	WP_019248658.1
1743	百日咳菌	YVLVKTNMV	2626	AAA22983.1
1744	百日咳菌	YYDYEDATF	2627	YP_006628018.1
1745	百日咳菌509	AAFIALYPNSQLAPT	2628	Q7VU05
1746	百日咳菌509	GGAEYNLALGQRRA	2629	Q7VU04
1747	百日咳菌509	GGAEYNLALGQRRADA	2630	Q7VU04
1748	百日咳菌509	IALYPNSQLAPT	2631	Q7VU05
1749	百日咳菌509	KPDQGEVVAVGPGKKTED	2632	P0A339.1
1750	百日咳菌509	KPDQGEVVAVGPGKKTEDG	2633	P0A339.1
1751	百日咳菌509	LAEVLDYHNFVLTQ	2634	Q7VWM1.1
1752	ジフテリア菌	QSIALSSLMVAQAIP	2635	AAV70486.1
1753	ジフテリア菌	SIGVLGYQKTVDHTKVNSKLSLF	2636	AAV70486.1
1754	百日咳菌	AAHADWNNQSIVKT	2637	ABO77783.1
1755	百日咳菌	AALGRG	2638	ABO77783.1
1756	百日咳菌	AALGRGHSLYASYE	2639	ABO77783.1
1757	百日咳菌	AAPLRRTTLAMALG	2640	ABO77783.1
1758	百日咳菌	AAPLSITLQAGAHA	2641	ABO77783.1
1759	百日咳菌	ADAQGDIVATELPS	2642	ABO77783.1
1760	百日咳菌	ADSGFYLDATLRAS	2643	ABO77783.1
1761	百日咳菌	AELA	2644	ABO77783.1
1762	百日咳菌	AELAVFRAGGGAYR	2645	ABO77783.1
1763	百日咳菌	AELQFRNGSVTSSG	2646	ABO77783.1
1764	百日咳菌	AGGRWHLGGLAGYT	2647	ABO77783.1
1765	百日咳菌	AGVAAMQGAVVHLQ	2648	ABO77783.1
1766	百日咳菌	AGYTRGDRGFTGDG	2649	ABO77783.1
1767	百日咳菌	ALASQARWTGATRA	2650	ABO77783.1

【表４２－５９】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1768	百日咳菌	AMPWTFHAGYRYSW	2651	ABO77783.1
1769	百日咳菌	AMQGAVVHLQRATIRRGDAP	2652	ABO77783.1
1770	百日咳菌	ANGLRVRDE	2653	ABO77783.1
1771	百日咳菌	ANGLRVRDEGGSSV	2654	ABO77783.1
1772	百日咳菌	ANKDGKVDIGTYRY	2655	ABO77783.1
1773	百日咳菌	APAAVSVLGASELT	2656	ABO77783.1
1774	百日咳菌	APPAPKPAPQPGPQ	2657	ABO77783.1
1775	百日咳菌	AQGILLENPAAELQ	2658	ABO77783.1
1776	百日咳菌	ARWTGATRAVDSLS	2659	ABO77783.1
1777	百日咳菌	ASLEAGRRFTHADG	2660	ABO77783.1
1778	百日咳菌	ASYEYSKGPKLAMP	2661	ABO77783.1
1779	百日咳菌	ATFTLANKD	2662	ABO77783.1
1780	百日咳菌	ATFTLANKDGKVDI	2663	ABO77783.1
1781	百日咳菌	ATRAVDSLSIDNAT	2664	ABO77783.1
1782	百日咳菌	DDDGIALYVAGEQAQ	2665	ABO77783.1
1783	百日咳菌	DDGIALYVAGEQAQ	2666	ABO77783.1
1784	百日咳菌	DGGHITGGRAAGVA	2667	ABO77783.1
1785	百日咳菌	DGIRRFLGTVTVKAGK	2668	ABO77783.1
1786	百日咳菌	DGSVDFQQPAEAGR	2669	ABO77783.1
1787	百日咳菌	DGYAVKGKYRTHGV	2670	ABO77783.1
1788	百日咳菌	DIVATELPSIPGTS	2671	ABO77783.1
1789	百日咳菌	DKLVVMQDASGQHR	2672	ABO77783.1
1790	百日咳菌	DLGLSDKLVVMQDA	2673	ABO77783.1
1791	百日咳菌	DNATWVMTDNSNVGA	2674	ABO77783.1
1792	百日咳菌	DNATWVMTDNSNVGALRLA	2675	ABO77783.1
1793	百日咳菌	DNRAGRRFDQKVAG	2676	ABO77783.1
1794	百日咳菌	EAGRFKVLTVNTLA	2677	ABO77783.1
1795	百日咳菌	ELAQSIVEAPELGA	2678	ABO77783.1
1796	百日咳菌	ELGAAIRVGRGARV	2679	ABO77783.1
1797	百日咳菌	ELGADHAVAVAGGR	2680	ABO77783.1
1798	百日咳菌	ELPSIPGTSIGPLD	2681	ABO77783.1
1799	百日咳菌	EPVKLTLTGGADAQ	2682	ABO77783.1
1800	百日咳菌	EQAQASIADSTLQG	2683	ABO77783.1
1801	百日咳菌	ERGANVTVQRSAIV	2684	ABO77783.1
1802	百日咳菌	ERQHGIHIQGSDPG	2685	ABO77783.1
1803	百日咳菌	EVGKRIELAGGRQV	2686	ABO77783.1
1804	百日咳菌	FDGAGTVHTNGIAH	2687	ABO77783.1
1805	百日咳菌	FQQPAEAGRFKVLT	2688	ABO77783.1

【表４２－６０】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1806	百日咳菌	FRAGGGAYRAANGL	2689	ABO77783.1
1807	百日咳菌	GAHAQGKALLYRVL	2690	ABO77783.1
1808	百日咳菌	GARVTVSGGSLSAP	2691	ABO77783.1
1809	百日咳菌	GAYRAANGLRVRDE	2692	ABO77783.1
1810	百日咳菌	GDAPAGGAVPGGAV	2693	ABO77783.1
1811	百日咳菌	GGAVPGGAVPGGFG	2694	ABO77783.1
1812	百日咳菌	GGAVPGGFGPVLDG	2695	ABO77783.1
1813	百日咳菌	GGFGPVLDGWYGVD	2696	ABO77783.1
1814	百日咳菌	GGLHIGALQSLQPE	2697	ABO77783.1
1815	百日咳菌	GGVQIERGANVTVQ	2698	ABO77783.1
1816	百日咳菌	GHSLYASYEYSKGP	2699	ABO77783.1
1817	百日咳菌	GHTDSVHVGGYATY	2700	ABO77783.1
1818	百日咳菌	GIAHRTELRGTRAE	2701	ABO77783.1
1819	百日咳菌	GKALLYRVLPEPVK	2702	ABO77783.1
1820	百日咳菌	GLGMAAALGRGHSL	2703	ABO77783.1
1821	百日咳菌	GNVIETGGARRFAP	2704	ABO77783.1
1822	百日咳菌	GPLDVALASQARWT	2705	ABO77783.1
1823	百日咳菌	GQHRLWVRN	2706	ABO77783.1
1824	百日咳菌	GRGFAQRQQLDNRA	2707	ABO77783.1
1825	百日咳菌	GRLGLEVGKRIELA	2708	ABO77783.1
1826	百日咳菌	GRQVQPYIKASVLQ	2709	ABO77783.1
1827	百日咳菌	GRRFTHADGWFLEPQAELA	2710	ABO77783.1
1828	百日咳菌	GSEPASANTLLLVQ	2711	ABO77783.1
1829	百日咳菌	GSSVLGRLGLEVGK	2712	ABO77783.1
1830	百日咳菌	GTTIKVSGRQAQGI	2713	ABO77783.1
1831	百日咳菌	GTVTVKAGKLVADH	2714	ABO77783.1
1832	百日咳菌	HAVAVAGGRWHLGG	2715	ABO77783.1
1833	百日咳菌	IELAGGRQVQPYIK	2716	ABO77783.1
1834	百日咳菌	IHIQGSDPGGVRTA	2717	ABO77783.1
1835	百日咳菌	IRRFLGTVTVKAGK	2718	ABO77783.1
1836	百日咳菌	IRVGRGARVTVSGG	2719	ABO77783.1
1837	百日咳菌	ITLQAGAHA	2720	ABO77783.1
1838	百日咳菌	ITLQAGAHAQGKAL	2721	ABO77783.1
1839	百日咳菌	IVEAPELGAAIRVG	2722	ABO77783.1
1840	百日咳菌	IVKTGERQHGIHIQ	2723	ABO77783.1
1841	百日咳菌	KAGKLVADHATLAN	2724	ABO77783.1
1842	百日咳菌	KGKYRTHGVGASLE	2725	ABO77783.1
1843	百日咳菌	KPAPQPGPQPPQPP	2726	ABO77783.1

【表４２－６１】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1844	百日咳菌	KVAGFELGADHAVA	2727	ABO77783.1
1845	百日咳菌	KVAGSDGYAVKGKY	2728	ABO77783.1
1846	百日咳菌	KVDIGTYRYRLAAN	2729	ABO77783.1
1847	百日咳菌	KVLTVNTLAGSGLF	2730	ABO77783.1
1848	百日咳菌	LAANGNGQWSLVGA	2731	ABO77783.1
1849	百日咳菌	LAMPWTFHAGYRYS	2732	ABO77783.1
1850	百日咳菌	LASTLWYAESNALS	2733	ABO77783.1
1851	百日咳菌	LENDFKVAGSDGYA	2734	ABO77783.1
1852	百日咳菌	LENPAAELQFRNGS	2735	ABO77783.1
1853	百日咳菌	LGAAPAAHADWNNQ	2736	ABO77783.1
1854	百日咳菌	LGGLAGYTRGDRGFTGDG	2737	ABO77783.1
1855	百日咳菌	LLENP	2738	ABO77783.1
1856	百日咳菌	LLVQTPLGSAATFT	2739	ABO77783.1
1857	百日咳菌	LPPSRVVLRDTNVT	2740	ABO77783.1
1858	百日咳菌	LQPEDLPPS	2741	ABO77783.1
1859	百日咳菌	LQPEDLPPSRVVLR	2742	ABO77783.1
1860	百日咳菌	LRASRLENDFKVAG	2743	ABO77783.1
1861	百日咳菌	LRLASDGSVDFQQP	2744	ABO77783.1
1862	百日咳菌	LSAAANAAVNTGGV	2745	ABO77783.1
1863	百日咳菌	LSAPHGNVIETGGA	2746	ABO77783.1
1864	百日咳菌	LSDDGIRRFLGTVT	2747	ABO77783.1
1865	百日咳菌	LVGAKAPPAPKPAP	2748	ABO77783.1
1866	百日咳菌	LYVAGEQAQASIAD	2749	ABO77783.1
1867	百日咳菌	MALGALGAAPAAHA	2750	ABO77783.1
1868	百日咳菌	MNMSLSRIVKAAPL	2751	ABO77783.1
1869	百日咳菌	MQDASGQHR	2752	ABO77783.1
1870	百日咳菌	MQGAVVHLQRATIR	2753	ABO77783.1
1871	百日咳菌	NAAVNTGGVGLAST	2754	ABO77783.1
1872	百日咳菌	NALSKRLGELRLNP	2755	ABO77783.1
1873	百日咳菌	NGQWSLVGAKAPPA	2756	ABO77783.1
1874	百日咳菌	NTLAGSGLFRMNVF	2757	ABO77783.1
1875	百日咳菌	PAGRELSAAANAAV	2758	ABO77783.1
1876	百日咳菌	PAPQPPAGRELSAA	2759	ABO77783.1
1877	百日咳菌	PGPQPPQPPQPQPE	2760	ABO77783.1
1878	百日咳菌	PGTSIGPLDVALAS	2761	ABO77783.1
1879	百日咳菌	PLGSAATFTLANKD	2762	ABO77783.1
1880	百日咳菌	PQPEAPAPQPPAGR	2763	ABO77783.1
1881	百日咳菌	PQPPQPQPEAPAPQ	2764	ABO77783.1

【表４２－６２】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1882	百日咳菌	PYIKASVLQEFDGA	2765	ABO77783.1
1883	百日咳菌	RFAPQAAPLSITLQ	2766	ABO77783.1
1884	百日咳菌	RLGELRLNPDAGGA	2767	ABO77783.1
1885	百日咳菌	RLNPDAGGAWGRGF	2768	ABO77783.1
1886	百日咳菌	RNGSVTSSGQLSDD	2769	ABO77783.1
1887	百日咳菌	RRFDQKVAGFELGA	2770	ABO77783.1
1888	百日咳菌	RTTLAMALGALGAA	2771	ABO77783.1
1889	百日咳菌	SAIVDGGLHIGALQ	2772	ABO77783.1
1890	百日咳菌	SANTLLLVQTPLGS	2773	ABO77783.1
1891	百日咳菌	SDPGGVRTASGTTI	2774	ABO77783.1
1892	百日咳菌	SELTLDGGHITGGR	2775	ABO77783.1
1893	百日咳菌	SGLFRMNVF	2776	ABO77783.1
1894	百日咳菌	SGLFRMNVFADLGL	2777	ABO77783.1
1895	百日咳菌	SGSSVELAQSIVEA	2778	ABO77783.1
1896	百日咳菌	SIADSTLQGAGGVQ	2779	ABO77783.1
1897	百日咳菌	SKGPKLAMPWTFHA	2780	ABO77783.1
1898	百日咳菌	SNVGALRLASDGSV	2781	ABO77783.1
1899	百日咳菌	SRIVKAAPLRRTTL	2782	ABO77783.1
1900	百日咳菌	SVLGASELTLDGGH	2783	ABO77783.1
1901	百日咳菌	SVLQEFDGA	2784	ABO77783.1
1902	百日咳菌	SVLQEFDGAGTVHT	2785	ABO77783.1
1903	百日咳菌	TELR	2786	ABO77783.1
1904	百日咳菌	TELRGTRAELGLGM	2787	ABO77783.1
1905	百日咳菌	TGDGGGHTDSVHVG	2788	ABO77783.1
1906	百日咳菌	TGGARRFAPQAAPL	2789	ABO77783.1
1907	百日咳菌	TGGRAAGVAAMQGA	2790	ABO77783.1
1908	百日咳菌	TGGVGLASTLWYAE	2791	ABO77783.1
1909	百日咳菌	THGVGASLEAGRRF	2792	ABO77783.1
1910	百日咳菌	TIRRGDAPA	2793	ABO77783.1
1911	百日咳菌	TLANVGDTWDDDGI	2794	ABO77783.1
1912	百日咳菌	TLQGAGGVQIERGA	2795	ABO77783.1
1913	百日咳菌	TLTGGADAQGDIVA	2796	ABO77783.1
1914	百日咳菌	TNVTAVPASGAPAA	2797	ABO77783.1
1915	百日咳菌	TRAELGLGMAAALG	2798	ABO77783.1
1916	百日咳菌	TSSGQLSDDGIRRF	2799	ABO77783.1
1917	百日咳菌	TVHTNGIAHRTELR	2800	ABO77783.1
1918	百日咳菌	TYRYRLAANGNGQW	2801	ABO77783.1
1919	百日咳菌	VADHATLANVGDTW	2802	ABO77783.1

【表４２－６３】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1920	百日咳菌	VHVGGYATYIADSG	2803	ABO77783.1
1921	百日咳菌	VLDGWYGVD	2804	ABO77783.1
1922	百日咳菌	VPASGAPAAVSVLG	2805	ABO77783.1
1923	百日咳菌	VRDEGGSSVLGRLG	2806	ABO77783.1
1924	百日咳菌	VRTASGTTIKVSGR	2807	ABO77783.1
1925	百日咳菌	VSGGSLSAPHGNVI	2808	ABO77783.1
1926	百日咳菌	VSGRQAQGILLENP	2809	ABO77783.1
1927	百日咳菌	VTVQRSAIVDGGLH	2810	ABO77783.1
1928	百日咳菌	VVLRDTNVTAVPAS	2811	ABO77783.1
1929	百日咳菌	WNNQSIVKTGERQH	2812	ABO77783.1
1930	百日咳菌	WVRNSGSEPASANT	2813	ABO77783.1
1931	百日咳菌	WYAESNALSKRLGE	2814	ABO77783.1
1932	百日咳菌	YATYIADSGFYLDA	2815	ABO77783.1
1933	百日咳菌	YGVDVSGSS	2816	ABO77783.1
1934	百日咳菌	YGVDVSGSSVELAQ	2817	ABO77783.1
1935	百日咳菌	YLDATLRASRLEND	2818	ABO77783.1
1936	百日咳菌	YRVLPEPVKLTLTG	2819	ABO77783.1
1937	百日咳菌	VKAQNITNKRAALIEA	2820	AAA22974.1
1938	百日咳菌	YYSNVTATRLLSSTNS	2821	AAA83981.1
1939	百日咳菌	SPNLTDERAAQAGVT	2822	CPP72976.1
1940	麻疹モルビリウイルス	SSRASDERAAHLPTS	2823	BAA33867.1
1941	ジフテリア菌	QVVHNSYNRPAYSPG	2824	1007216A
1942	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AEGGEIHEL	2825	AAF85692.1
1943	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AENLISNGIGKY	2826	AAF85698.1
1944	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AEVDGDVKL	2827	CAB43772.1
1945	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AIYTAEIHK	2828	AAF85697.1
1946	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	APVFHMTNY	2829	CAB43772.1
1947	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	APVFHMTNYLEQPVSN	2830	AAR89413.1
1948	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AQRLNEIY	2831	AAF85698.1
1949	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	ARVPHAYSL	2832	AAF85698.1
1950	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AVRDLERAM	2833	P03424.1
1951	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	AVRDLERAMTTLK	2834	P03424.1

【表４２－６４】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1952	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	DALLRLQAM	2835	Q89933.1
1953	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	DIKEKVINL	2836	AAF85698.1
1954	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	DQGLFKVL	2837	AAF85695.1
1955	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	DTGVDTRIW	2838	Q9EMA9.1
1956	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	EPIGSLAIEEAM	2839	AAF85692.1
1957	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	EPIRDALNAM	2840	P69354.1
1958	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	FPKLGKTL	2841	AAF85692.1
1959	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	FRSVNAVAF	2842	AAF85695.1
1960	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GKIIDNTEQL	2843	AAF85695.1
1961	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GLNEKLVFY	2844	AAF85695.1
1962	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GMYGGTYLVEK	2845	AAC35876.2
1963	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GPPISLERLDVGTN	2846	P69354.1
1964	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GPRQAQVSFL	2847	Q89933.1
1965	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GRLVPQVRVID	2848	AAF85695.1
1966	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	GSAPISMGFR	2849	AAF85692.1
1967	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	HILAKSTAL	2850	AAF85698.1
1968	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	HYREVNLVY	2851	AAF85698.1
1969	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	IPPMKNLAL	2852	AAC35876.2
1970	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	IPYQGSGKGVSF	2853	CAB43772.1
1971	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	ISKESQHVY	2854	AAF85698.1
1972	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	IVSSHFFVY	2855	AAF85698.1
1973	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KEIKETGRLF	2856	AAF85698.1
1974	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KESQHVYYL	2857	AAF85698.1
1975	麻疹ウイルス株エドモ	KIIDNTEQL	2858	AAF85695.1

【表４２－６５】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
	ンストン-B			
1976	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KKQINRQN	2859	AAA63285.1
1977	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KKVDTNFIYQ	2860	AAF85698.1
1978	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KLIDGFFPA	2861	AAF85698.1
1979	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KPNLSSKRSEL	2862	BAB39848.1
1980	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	KVSPYLFTV	2863	AAR89413.1
1981	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	LETRTTNQFL	2864	CAB43772.1
1982	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	LLKEATEL	2865	AAF85695.1
1983	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	LLKKGNSLY	2866	AAF85698.1
1984	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	LPAPIGGMNY	2867	AAF85698.1
1985	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	MPEETLHQVM	2868	AAF85698.1
1986	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	PTTIRGQFS	2869	CAB43772.1
1987	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	QEISRHQALGY	2870	P03424.1
1988	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	RITHVDTESY	2871	P69354.1
1989	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	RPGLKPDL	2872	P69354.1
1990	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	RPIYGLEV	2873	AAF85698.1
1991	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	RQAGQEMILAV	2874	P69354.1
1992	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SAVRIATVY	2875	AAF85698.1
1993	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SLMPEETLHQV	2876	AAF85698.1
1994	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SMIDLVTKF	2877	AAF85698.1
1995	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SMLNSQAIDNLRA	2878	P69354.1
1996	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SMYRVFEV	2879	CAB43772.1
1997	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	SQQGMFHAY	2880	AAF85698.1
1998	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	TDTPIVYNDRNLLD	2881	Q89933.1

【表４２－６６】

番号	疾患	エピトープアミノ酸配列	配列番号	受託番号
1999	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	VIINDDQGLFKV	2882	AAF85695.1
2000	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	YESGVRIASL	2883	AAF85698.1
2001	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	YLKDKALA	2884	AAF85698.1
2002	麻疹ウイルス株エドモンストン-B	YVYDHSGEAVK	2885	AAF85692.1
2003	風疹ウイルス	ARVIDPAAQSFTGVV	2886	BAA28178.1
2004	風疹ウイルス	SDRASARVIDPAAQS	2887	BAA28178.1
2005	風疹ウイルス	VPPGKFVTAALLNTP	2888	BAA28178.1
2006	風疹ウイルス	WVTPVIGSQARKCGL	2889	BAA28178.1
2007	ムンプスルブラウイルス	GTYRLIPNARANLTA	400	AGC97176.1

【０８０９】

E．多重フラッププライム編集因子の送達

別の側面において、本開示は、種々の戦略を用いてin vitroおよびin vivoの多重フラッププライム編集因子の送達を可能にし、分裂インテインを用いる別個のベクター、ならびにエレクトロポレーションなどの技術を用いるリボヌクレオタンパク質複合体(すなわち、PEgRNAおよび/または第2部位gRNAと複合体化したプライム編集因子)、カチオン性脂質によって媒介される製剤の使用、およびリボヌクレオタンパク質複合体に融合された受容体リガンドを用いる誘導性エンドサイトーシス法という直接的送達戦略を包含する。いずれかのかかる方法が本願において企図される。

【０８１０】

送達オプションの概観

いくつかの側面では、本発明は、1以上のプライム編集因子をコードするポリヌクレオチド、例えば本明細書に記載の多重フラッププライム編集システムの1以上の構成要素をコードする本明細書に記載の1以上のベクター、その1以上の転写物、および/または次いで転写される1以上のタンパク質を、ホスト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、かかる方法によって生ずる細胞、およびかかる細胞を含むかまたは次いで生ずる生物(例えば動物、植物、または真菌)を提供する。いくつかの態様では、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は、ガイド配列との組み合わせで(任意に、それと複合体化されて)、細胞に送達される。従来のウイルスおよび非ウイルスに基づく遺伝子移入方法が、哺乳類細胞または標的組織において核酸を導入するために用いられ得る。かかる方法は、多重フラッププライム編集因子システムの構成要素をコードする核酸を培養中のまたはホスト生物中の細胞に投与するために用いられ得る。非ウイルスベクター送達システムは、DNAプラスミド、RNA(例えば、本明細書に記載のベクターの転写物)、裸の核酸、およびリポソームなどの送達基剤と複合体化した核酸を包含する。ウイルスベクター送達システムはDNAおよびRNAウイルスを包含し、これらは細胞への送達後にエピソーム性のまたは取り入れされたゲノムどちらかを有する。遺伝子療法の総説については、Anderson,Science 256:808-813(1992);Nabel & Felgner,TIBTECH 11:211-217(1993);Mitani & Caskey,TIBTECH 11:162-166(1993);Dillon,TIBTECH 11:167-175(1993);Miller,Nature 357:455-460(1992);Van Brunt,Biotechnology 6(10):1149-1154(1988);Vigne,Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36(1995);Kremer & Perricaudet,British Medical Bulletin 51(1):31-44(1995);Haddada et al.,in Current Topi

cs in Microbiology and Immunology Doerfler and Bihm(eds)(1995);およびYu et al.,Gene Therapy 1:13-26(1994)を参照。

【０８１１】

核酸の非ウイルス的送達の方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの薬剤によって増強された取り込みを包含する。リポフェクションは例えば米国特許第5,049,386号、第4,946,787号;および第4,897,355号に記載され、リポフェクション試薬は市販で販売されている(例えば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションにとって好適であるカチオン性および中性脂質は、FeignerのWO91/17424;WO91/16024のものを包含する。送達は細胞(例えば、in vitroのまたはex vivoの投与)または標的組織(例えばin vivoの投与)であり得る。

【０８１２】

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)。

【０８１３】

核酸の送達のためのRNAまたはDNAウイルスに基づくシステムの使用は、体の特定の細胞へとウイルスを標的化およびウイルスペイロードを核に輸送するための高度に進化したプロセスを利する。ウイルスベクターは、直接的に患者に投与され得るか(in vivo)、またはそれらはin vitroの細胞を処置するために用いられ得、改変された細胞が任意に患者に投与され得る(ex vivo)。従来のウイルスに基づくシステムは、遺伝子移入のためのレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴、および単純ヘルペスウイルスベクターを包含し得る。ホストゲノムへの取り入れはレトロウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルス遺伝子移入法で可能であり、多くの場合には、挿入されたトランスジーンの長期的発現をもたらす。加えて、高い形質導入効率が多くの異なる細胞型および標的組織で観察されている。

【０８１４】

ウイルスのトロピズムは外生のエンベロープタンパク質を組み込むことによって変改され得、標的細胞の可能性ある標的集団を拡張する。レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入または感染する能力があるレトロウイルスベクターであり、典型的には高いウイルス力価を生ずる。よって、レトロウイルス遺伝子移入システムの選択は標的組織に依存するであろう。レトロウイルスベクターはシスに作用する長い末端反復からなり、最高で6-10kbの外生の配列のパッケージング容量を有する。最小のシスに作用するLTRはベクターの複製およびパッケージングにとって十分であり、これらは次いで治療学的な遺伝子を標的細胞に取り入れするために用いられて、永久的なトランスジーン発現を提供する。広く用いられるレトロウイルスベクターは、ネズミ白血病ウイルス(MuLV)、テナガザル白血病ウイルス(GaLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびそれらの組み合わせに基づくものを包含する(例えば、Buchscher et al.,J.Virol.66:2731-2739(1992);Johann et al.,J.Virol.66:1635-1640(1992);Sommnerfelt et al.,Virol.176:58-59(1990);Wilson et al.,J.Virol.63:2374-2378(1989);Miller et al.,J.Virol.65:2220-2224(1991);PCT/US94/05700を見よ)。一過性の発現が好ましい適用では、アデノウイルスに基づくシステムが用いられ得る。アデノウイルスに基づくベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率

ができ、細胞分裂を要求しない。かかるベクターによって、高い力価および発現レベルが得られている。このベクターは相対的に単純なシステムによって大きい数量で生じ得る。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターもまた細胞に標的核酸を形質導入するために、例えば、核酸およびペプチドのin vitro生産にならびにin vivoおよびex vivoの遺伝子治療手続きに用いられ得る(例として、West et al.,Virology 160:38-47(1987);米国特許第4,797,368号;WO93/24641;Kotin,Human Gene Therapy 5:793-801(1994);Muzyczka,J.Clin.Invest.94:1351(1994)を参照)。組換えAAVベクターの構築は、米国特許第5,173,414号;Tratschin et al.,Mol.Cell.Biol.5:3251-3260(1985);Tratschin,et al.,Mol.Cell.Biol.4:2072-2081(1984);Hermonat & Muzyczka,PNAS 81:6466-6470(1984);およびSamulski et al.,J.Virol.63:03822-3828(1989)を包含する数多の刊行物に記載されている。

【０８１５】

パッケージング細胞は、ホスト細胞に感染することができるウイルス粒子を形成するために典型的に用いられる。かかる細胞は、アデノウイルスをパッケージングする293細胞およびレトロウイルスをパッケージングするψ2細胞またはPA317細胞を包含する。遺伝子治療に用いられるウイルスベクターは、通常は、核酸ベクターをウイルス粒子にパッケージングする細胞株を生ずることによって生成される。ベクターは、典型的には、パッケージングおよびホストへの続く取り入れに要求される最小限のウイルス配列を含有し、他のウイルス配列は発現されるべきポリヌクレオチド(単数または複数)の発現カセットによって置き換えられる。欠けているウイルス機能は典型的にはパッケージング細胞株によってトランスで供給される。例えば、遺伝子治療に用いられるAAVベクターは、典型的には、パッケージングおよびホストゲノムへの取り入れに要求されるAAVゲノムからのITR配列のみを所有する。ウイルスDNAは細胞株によってパッケージングされ、これは、他のAAV遺伝子つまりrepおよびcapをコードするがITR配列を欠くヘルパープラスミドを含有する。細胞株はヘルパーとしてのアデノウイルスにもまた感染し得る。ヘルパーウイルスはAAVベクターの複製およびヘルパープラスミドからのAAV遺伝子の発現を促進する。ヘルパープラスミドはITR配列の欠如を原因として有意な量ではパッケージングされない。アデノウイルスによるコンタミネーションは、例えば、アデノウイルスがAAVよりも敏感である熱処置によって縮減され得る。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、参照によって本願に組み込まれるUS20030087817を見よ。

【０８１６】

種々の態様において、二重PE構築物(分裂構築物を包含する)は1以上のrAAVベクターによる送達のために操作され得る。本願において提供される方法および組成物のいずれかに関するrAAVは、いずれかの誘導体またはシュードタイプを包含するいずれかの血清型であり得る(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、2/1、2/5、2/8、2/9、3/1、3/5、3/8、または3/9)。rAAVは細胞に送達されるべきである遺伝子積荷(すなわち、rAAVによって細胞内に持ち込まれる丸ごとのまたは分裂のPE融合タンパク質などの目当ての遺伝子を発現する組み換え核酸ベクター)を含み得る。rAAVはキメラであり得る。

【０８１７】

rAAVの本願において用いられる血清型は、組み換えウイルスのカプシドタンパク質の血清型を言う。誘導体およびシュードタイプの限定しない例は、rAAV2/1、rAAV2/5、rAAV2/8、rAAV2/9、AAV2-AAV3ハイブリッド、AAVrh.10、AAVhu.14、AAV3a/3b、AAVrh32.33、AAV-HSC15、AAV-HSC17、AAVhu.37、AAVrh.8、CHt-P6、AAV2.5、AAV6.2、AAV2i8、AAV-HSC15/17、AAVM41、AAV9.45、AAV6(Y445F/Y731F)、AAV2.5T、AAV-HAE1/2、AAVクローン32/83、AAVShH10、AAV2(Y-＞F)、AAV8(Y733F)、AAV2.15、AAV2.4、AAVM41、およびAAVr3.45を包含する。キメラVP1タンパク質を有する誘導体およびシュードタイプの限定しない例はrAAV2/5-1VP1uであり、これはAAV2のゲノム、AAV5のカプシドバックボー

ン、およびAAV1のVP1uを有する。キメラVP1タンパク質を有する誘導体およびシュードタイプの他の限定しない例はrAAV2/5-8VP1u、rAAV2/9-1VP1u、およびrAAV2/9-8VP1uである。

【０８１８】

AAV誘導体/シュードタイプ、およびかかる誘導体/シュードタイプを生ずるための方法は、当該技術分野で公知である(例えば、Mol Ther.2012 Apr;20(4):699-708.doi:10.1038/mt.2011.287.Epub 2012 Jan 24.The AAV vector toolkit:poised at the clinical crossroads.Asokan A1,Schaffer DV,Samulski RJ.を見よ)。シュードタイプのrAAVベクターを生ずるおよび用いるための方法は当該技術分野で公知である(例えば、Duan et al.,J.Virol.,75:7662-7671,2001;Halbert et al.,J.Virol.,74:1524-1532,2000;Zolotukhin et al.,Methods,28:158-167,2002;およびAuricchio et al.,Hum.Molec.Genet.,10:3075-3081,2001を見よ)。

【０８１９】

rAAV粒子を作るまたはパッケージングする方法は当該技術分野で知られており、試薬が市販で利用可能である(例えば、Zolotukhin et al.Production and purification of serotype 1,2,and 5 recombinant adeno-associated viral vectors.Methods 28(2002)158-167;および米国特許公開番号US20070015238およびUS20120322861を見よ。これらは参照によって本願に組み込まれる;プラスミドおよびキットはATCCおよびCell Biolabs,Inc.から利用可能)。例えば、目当ての遺伝子を含むプラスミドが、例えばrep遺伝子(例えば、Rep78、Rep68、Rep52、およびRep40をコードする)およびcap遺伝子(本明細書に記載の改変されたVP2領域を包含するVP1、VP2、およびVP3をコードする)を含有する1以上のヘルパープラスミドと組み合わせられ、組み換え細胞にトランスフェクションされ得る。その結果、rAAV粒子がパッケージングされ、続いて精製され得る。

【０８２０】

組み換えAAVは核酸ベクターを含み得、これは、最小で:(a)目当てのタンパク質もしくはポリペプチドまたは目当てのRNA(例えば、siRNAもしくはmicroRNA)をコードする配列を含む1以上の異種核酸領域と、(b)1以上の核酸領域(例えば、異種核酸領域)をフランキングする逆位末端反復(ITR)配列(例えば、野生型ITR配列または操作されたITR配列)を含む1以上の領域とを含み得る。本願において、目当てのタンパク質または目当てのRNAをコードする配列を含む異種核酸領域は目当ての遺伝子と言われる。

【０８２１】

本願において提供されるrAAV粒子のいずれか1つは、VP1u領域の外に異なる血清型のアミノ酸を有するカプシドタンパク質を有し得る。いくつかの態様では、VP1タンパク質のバックボーンの血清型はITRおよび/またはRep遺伝子の血清型とは異なる。いくつかの態様では、粒子のVP1カプシドタンパク質のバックボーンの血清型はITRの血清型と同じである。いくつかの態様では、粒子のVP1カプシドタンパク質のバックボーンの血清型はRep遺伝子の血清型と同じである。いくつかの態様では、rAAV粒子のカプシドタンパク質は改善された形質導入効率をもたらすアミノ酸変異を含む。

【０８２２】

いくつかの態様では、核酸ベクターは、核酸(例えば、異種核酸)の発現を容易化する配列、例えば核酸に作動可能に連結された発現コントロール配列を含む1以上の領域を含む。数々のかかる配列が当該技術分野で公知である。発現コントロール配列の限定しない例は、プロモーター、インシュレーター、サイレンサー、応答エレメント、イントロン、エンハンサー、開始部位、終結シグナル、およびポリAテールを包含する。かかるコントロール配列のいずれかの組み合わせは本願において企図される(例えば、プロモーターおよびエンハンサー)。

【０８２３】

最終的なAAV構築物はPEgRNAをコードする配列を組み込み得る。他の態様において、AAV構築物は、第2部位ニッキングガイドRNAをコードする配列を組み込み得る。な

お他の態様において、AAV構築物は、第2部位ニッキングガイドRNAをコードする配列とPEgRNAをコードする配列とを組み込み得る。

【０８２４】

種々の態様において、PEgRNAおよび第2部位ニッキングガイドRNAは、適当なプロモーター、例えばヒトU6(hU6)プロモーター、マウスU6(mU6)プロモーター、または他の適当なプロモーターから発現され得る。PEgRNAおよび第2部位ニッキングガイドRNAは同じプロモーターまたは異なるプロモーターから駆動され得る。

【０８２５】

いくつかの態様では、rAAV構築物または本願の組成物は対象に経腸的に投与される。いくつかの態様では、rAAV構築物または本願の組成物は対象に非経口的に投与される。いくつかの態様では、rAAV粒子または本願の組成物は、対象に皮下で、眼内で、硝子体内で、網膜下で、静脈内で(IV)、脳室内で、筋肉内で、髄腔内で(IT)、脳槽内で、腹腔内で、吸入によって、局所的に、または1以上の細胞、組織、もしくは臓器への直接的注射によって投与される。いくつかの態様では、rAAV粒子または本願の組成物は、対象に肝動脈または門脈への注射によって投与される。

【０８２６】

分裂多重フラップPEベクターに基づく戦略

この側面では、多重フラッププライム編集因子は分裂部位において割られ得、丸ごとの/完全なプライム編集因子の2つの半分として提供され得る。2つの半分は細胞に送達され得(例えば、発現されたタンパク質として、または別個の発現ベクター上において)、ひとたび細胞内で接触をすると、2つの半分は各プライム編集因子半分のインテインの自己スプライシング作用によって完全なプライム編集因子を形成する。細胞内におけるそれらのトランススプライシングと完全な機能するPEの付随的復元とを容易化するために、分裂インテイン配列が、コードされるプライム編集因子の半分の夫々に操作され得る。

【０８２７】

これらの分裂インテインに基づく方法はin vivo送達のいくつかの関門を克服する。例えば、プライム編集因子をコードするDNAはrAAVパッケージング限界よりも大きく、そのため、特殊な解決を要求する。1つのかかる解決は、分裂インテインペアに融合された編集因子を製剤することであり、これらが2つの別個のrAAV粒子にパッケージングされ、これらは細胞に同時送達されるときに機能的な編集因子タンパク質を再構成する。多重フラッププライム編集の固有の特色を説明するいくつかの他の特殊な考慮事項が記載され、第2部位ニッキング標的の最適化と、レンチウイルスおよびrAAVを包含するウイルスベクターに多重フラッププライム編集因子を適切にパッケージングすることとを包含する。

【０８２８】

この側面では、多重フラッププライム編集因子は分裂部位において割られ得、丸ごとの/完全なプライム編集因子の2つの半分として提供され得る。2つの半分は細胞に送達され得(例えば、発現されたタンパク質として、または別個の発現ベクター上において)、ひとたび細胞内で接触をすると、2つの半分は各プライム編集因子半分のインテインの自己スプライシング作用によって完全なプライム編集因子を形成する。細胞内におけるそれらのトランススプライシングと完全な機能するPEの付随的復元とを容易化するために、分裂インテイン配列が、コードされるプライム編集因子の半分の夫々に操作され得る。

【０８２９】

図66は、2つのPEの半分のタンパク質として提供されているプライム編集因子の1つの態様を図示する。これらは、プライム編集因子の半分のタンパク質の夫々の終わりまたは始まりに位置付けられた分裂インテインの半分同士の自己スプライシング作用によって、丸ごとのプライム編集因子を再生する。本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子もまた、同じ形で提供されてもよい。本願において用いられる用語「PE N末端半分」は、完全なプライム編集因子のPE N末端半分のC末端の端に「Nインテイン」を含む、完全なプライム編集因子のN末端半分を言う(すなわち、N末端エクステイン)。「Nイン

テイン」は、完全な十分に形成された分裂インテイン部分のN末端半分を言う。本願において用いられる用語「PE C末端半分」は、完全なプライム編集因子のC末端半分のN末端の端に「Cインテイン」を含む完全なプライム編集因子のC末端半分を言う(すなわち、C末端エクステイン)。2つの半分タンパク質、すなわちPE N末端半分およびPE C末端半分が例えば細胞内において互いと接触をするときには、NインテインおよびCインテインは、自己切除とPE N末端半分のC末端の端およびPE C末端半分のN末端の端の間のペプチド結合の形成との同時プロセスを経過して、完全なnapDNAbpドメイン(例えばCas9ニッカーゼ)およびRTドメインを含む完全なプライム編集因子タンパク質を再形成する。図面には示されていないが、プライム編集因子は、N末端および/またはC末端のNLSと各ドメインを連結するアミノ酸リンカー配列とを包含する追加の配列をもまた含み得る。

【０８３０】

種々の態様において、多重フラッププライム編集因子は、丸ごとのプライム編集因子を「分裂部位」において(as)「分裂」することによって、2つの半分タンパク質(すなわち、PE N末端半分およびPE C末端半分)として操作され得る。「分裂部位」は、プライム編集因子上の2つの隣接するアミノ酸残基の間における分裂インテイン配列(すなわち、NインテインおよびCインテイン)の挿入の位置付けを言う。より具体的には、「分裂部位」は丸ごとのプライム編集因子を2つの別個の半分へと割る位置付けを言い、各半分は分裂部位においてNインテインまたはCインテインモチーフどちらかに融合される。分裂部位はプライム編集因子融合タンパク質上のいずれかの好適な位置付けであり得るが、好ましくは、分裂部位は送達(例えば発現ベクターによる)にとって適当なサイズである2つの半分タンパク質の形成を許す位置に位置付けられ、分裂部位末端において各半分タンパク質に融合されているインテインは、1つの半分タンパク質が細胞内において他の半分タンパク質に接触するときに互いと十分に相互作用するように利用可能である。

【０８３１】

いくつかの態様では、分裂部位はnapDNAbpドメイン上に位置付けられる。他の態様において、分裂部位はRTドメイン上に位置付けられる。他の態様において、分裂部位はnapDNAbpドメインおよびRTドメインを連結するリンカー上に位置付けられる。

【０８３２】

種々の態様において、分裂部位デザインは、2つの半分のプライム編集因子ドメインを2つの異なるAAVゲノムにパッケージングする目的を両方が構造的に許容するNおよびC末端インテインを分裂および挿入するための部位を見出すことを要求する。加えて、トランススプライシングに必要なインテイン残基は、C末端エクステインのN末端の残基を変異させることまたはインテインの「傷跡」を残すであろう残基を挿入することによって組み込まれ得る。

【０８３３】

SpCas9ニッカーゼまたはSaCas9ニッカーゼどちらかを含む分裂された多重フラップ(例えば二重フラップまたは四重フラップ)プライム編集因子の例示の分裂構成は次のとおりである。

【表４３－１】

S.PYOGENES PE、リンカーでの分裂、N 末端部分 構造:[N エクステイン]-[N インテイン]
MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTD** **RHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDS** **FFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL** **IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA** **ILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS** **KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKR** **YDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPIL** **EKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDN** **REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIE** **RMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI** **VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK** **DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGW** **GRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSG** **QGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT** **QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVD** **QELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKN** **YWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS** **RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAV** **VGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKT** **EITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGG** **FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSV** **KELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASA** **GELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQI** **SEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI** **DRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSSGGS**CLSYETEILTVEY GLLPIGKIVEKRIECTVYSVDNNGNIYTQPVAQWHDRGEQEVFEYCLEDGSLIRATKDH

【表４３－２】

KFMTVDGQMLPIDEIFERELDLMRVDNLPNSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号443） 凡例: NLS（配列番号124、125） CAS9（配列番号445） リンカー配列番号446） NPUNインテイン（配列番号447）

【表４３－３】

S.PYOGENES PE、リンカーでの分裂、C 末端部分 構造:[C エクステイン]-[N インテイン]
MKRTADGSEFESPKKKRKV*IKIATRKYLGKQNVYDIGVERDHNFALKNGFIASN***CFNSGSE*** **TPGTSESATPESSGGSSGGSS***TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMG* *LAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKP* *GTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQP* *LFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLL* *AATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVM* *GQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQQKAYQEIKQAL* *LTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMV* *AAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPV* *VALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAG* *AAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRR* *GLLTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITET* *PDTSTLLIENSSP***SGGS**KRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号450）
凡例: NLS（配列番号124、125） リンカー1（配列番号453） リンカー2（配列番号174） *NPUCインテイン*（配列番号452） *RT*（配列番号454）
S.AUREUS PE、SPLIT BETWEEN 残基 740/741 間の分裂、N 末端部分 構造:[N エクステイン]-[N インテイン]
MKRTADGSEFESPKKKRKV**GKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEA** **NVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK** **GLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYV** **AELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLE** **TRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALN** **DLNNLVITRDENEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTS** **TGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELT** **QEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQ** **KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINE**

【表４３－４】

KFMTVDGQMLPIDEIFERELDLMRVDNLPNSGGSKRTADGSEFEPKKKRKV（配列番号443） 凡例: NLS（配列番号124、125） CAS9（配列番号445） リンカー配列番号446） NPUNインテイン（配列番号447）

【０８３４】

種々の態様では、例としてSpCas9ニッカーゼ(配列番号18、1368アミノ酸)を用いて、分裂は、1および1368の間のいずれかの2つのアミノ酸の間においてであり得る。しかしながら、好ましい分裂は、タンパク質の中心領域の間に、例えば、配列番号18のアミノ酸50～1250、または100～1200、または150～1150、または200～1100、ま

たは250～1050、または300～1000、または350～950、または400～900、または450～850、または500～800、または550～750、または600～700に位置付けられるであろう。特定の例示の態様では、分裂部位は740/741、または801/802、または1010/1011、または1041/1042の間であり得る。他の態様において、分裂部位は、配列番号18のSpCas9に対して相対的に、1/2、2/3、3/4、4/5、5/6、6/7、7/8、8/9、9/10、10/11、12/13、14/15、15/16、17/18、19/20、20/21、21/22、22/23、23/24、24/25、25/26、26/27、27/28、28/29、29/30、30/31、31/32、32/33、33/34、34/35、35/36、36/37、38/39、39/40、41/42、42/43、43/44、44/45、45/46、46/47、47/48、48/49、49/50、51/52、52/53、53/54、54/55、55/56、56/57、57/58、58/59、59/60、61/62、62/63、63/64、64/65、65/66、66/67、67/68、68/69、69/70、71/72、72/73、73/74、74/75、75/76、76/77、77/78、78/79、79/80、81/82、82/83、83/84、84/85、85/86、86/87、87/88、88/89、89/90の間、または90～100、100～150、150～200、200～250、250～300、300～350、350～400、450～500、500～550、550～600、600～650、650～700、700～750、750～800、800～850、850～900、900～950、950～1000、1000～1050、1050～1100、1100～1150、1150～1200、1200～1250、1250～1300、1300～1350、および1350～1368の間の隣接する残基のいずれか2つのペアの間、配列番号18と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、または99.9%配列同一性を有するアミノ酸配列上のいずれか2つの対応する残基の間、あるいは配列番号19～88のアミノ酸配列のいずれかのSpCas9のバリアントもしくは等価物、または配列番号19～88のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%、99%、もしくは99.9%配列同一性を有するアミノ酸配列のいずれか2つの対応する残基の間であり得る。

【0835】

種々の態様において、分裂インテイン配列は次のインテイン配列からによって操作され得る。

【表44－1】

名称	リガンド依存性インテインの配列
2-4 インテイン:	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVV HNC(配列番号472)
3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT

【表４４－２】

	FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYTNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC（配列番号473）
30R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号474）
30R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号475）
30R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPIPYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号476）
37R3-1 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGN SLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYNPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVH MINWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGV YTFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLIL SHIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQ AFADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGV VVHNC（配列番号477）
37R3-2 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAAAKDGTLLARPVVSWFDQ GTRDVIGLRIAGGAIVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNS LALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHM INWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNL LLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILS HIRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQA FADALDDKFLHDMLAEGLRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVV VHNC（配列番号478）
37R3-3 インテイン	CLAEGTRIFDPVTGTTHRIEDVVDGRKPIHVVAVAKDGTLLARPVVSWFDQG TRDVIGLRIAGGATVWATPDHKVLTEYGWRAAGELRKGDRVAGPGGSGNSL ALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTSPFSEASMMGLLTNLADRELVHMI NWAKRVPGFVDLTLHDQAHLLERAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLL

【表４４－３】

	LDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVYT FLSSTLKSLEEKDHIHRALDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQHQRLAQLLLILSH IRHMSNKGMEHLYSMKYKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAGGSGASRVQAFA DALDDKFLHDMLAEELRYSVIREVLPTRRARTFDLEVEELHTLVAEGVVVH NC（配列番号479）

【０８３６】

種々の他の態様において、分裂インテイン配列は次のとおり用いられ得る:

【表４５】

インテイン-N	インテイン-C
NPU-N CLSYETEILTVEYGLLPIGKIVEKRIECTVYS VDNNGNIYTQPVAQWHDRGEQEVFEYCLE DGSLIRATKDHKFMTVDGQMLPIDEIFEREL DLMRVDNLPNSGGS （配列番号447）	NPU-C IKIATRKYLGKQNVYDIGVERDHNFALKNGFIASN （配列番号452）

【０８３７】

種々の態様において、分裂インテインは完全なPE融合タンパク質の別個の部分を細胞に別個に送達するために用いられ得、これらは、細胞内での発現によって、トランススプライシングによって完全なPE融合タンパク質として再構成されるようになる。

【０８３８】

いくつかの態様では、本開示は、PE融合タンパク質を細胞に送達する方法を提供し:

(a)第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のN末端フラグメントをコードする第1の発現ベクターを構築すること;

(b)第2の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のC末端フラグメントをコードする第2の発現ベクターを構築すること;

(c)第1および第2の発現ベクターを細胞に送達すること、

を含み、

第1および第2の分裂インテイン配列の自己切除を引き起こすトランススプライシング活性の結果として、N末端およびC末端フラグメントは、細胞内においてPE融合タンパク質として再構成される。

【０８３９】

分裂部位は、いくつかの態様では、napDNAbpドメイン、リンカー、または逆転写酵素ドメインを包含するプライム編集因子融合体のどこかであり得る。

【０８４０】

他の態様において、分裂部位はnapDNAbpドメイン上である。

【０８４１】

なお他の態様において、分裂部位は逆転写酵素またはポリメラーゼドメイン上である。

【０８４２】

さらに他の態様において、分裂部位はリンカー上である。

【０８４３】

種々の態様において、本開示は、napDNAbp(例えばCas9ドメイン)と逆転写酵素とを含む多重フラッププライム編集因子を提供し、napDNAbpおよび/または逆転写酵素の1つまたは両方は、インテイン、例えばリガンド依存性インテインを含む。典型的には、インテインはリガンド依存性インテインであり、これはリガンド(例えば、4-ヒドロキシタモキシフェンなどの低分子、ペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、アミノ酸、およびヌクレオチド)の不在下ではタンパク質スプライシング活性を発揮しないか、または最小限発揮する。リガンド依存性インテインは知られており、米国2014/0065711A1として公開された米国特許出願第(U.S.S.N.)14/004,280号に記載されているものを包含する。これの内容全体は参照によって本願に組み込まれる。加えて、分裂Cas9アーキテクチャの使用、いくつかの態様では、インテインは配列番号8～15、447、452、462、および472～479からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０８４４】

種々の態様において、napDNAbpドメインは配列番号18の標準的なSpCas9ドメインと比較して小さいサイズのnapDNAbpドメインである。

【０８４５】
標準的なSpCas9タンパク質は長さが1368アミノ酸であり、158キロダルトンという予測される分子量を有する。本願において用いられる用語「小さいサイズのCas9バリアント」は、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アミノ酸未満だが、少なくとも約400アミノ酸よりも大きく、かつCas9タンパク質の要求される機能を保持する、天然に存在するか、操作されたか、または別様のいずれかのCas9バリアントを言う。
【０８４６】
1つの態様では、例20に図示されるとおり、本明細書は次の分裂インテインPE構築物を包摂する。これらは標準的なSpCas9(配列番号18)の残基1024および1025の間で分裂される(または、これらはMetマイナスの配列番号18に対して相対的に夫々残基1023および1024と言われ得る)。
【０８４７】
第1に、配列番号18のアミノ酸配列は次のとおり示される。1024(「K」)および1025(「S」)残基の間の分裂部位の位置付けを指示している:

【表４６】

説明	配列	配列番号
SpCas9 Streptococcus pyogenes M1 SwissProt受託番号 Q99ZW2 野生型	**M**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHE KYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGD LNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARL SKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAE DAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILL SDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEE LLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPF LKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPW NFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFT VYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDK DFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKV MKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTR SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKY DENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAH DAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA**KS**EQ EIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI VWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKR NSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSK KLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLP KYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASH YEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADA NLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFD TTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD	配列番号18 太字の分裂部位1024/1025と共に指示されている。 位置1のMはある種の態様のPE融合タンパク質では必ずしも存在しない。それゆえに、アミノ酸配列が位置1のMetを排除するケースでは、分裂部位の付番は1023/1024である。

【０８４８】

この構成において、Ｎ末端半分のアミノ酸配列(アミノ酸１～１０２４)は以下のとおりである:

【０８４９】

【化５】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLF
DSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEED
KKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGH
FLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLI
AQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIG
DQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ
QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLL
RKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARG
NSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLY
EYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKK
IECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREM
IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGF
ANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVD
ELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVE
NTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLT
RSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDK
AGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQ
FYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA**K**

(配列番号 3877).

【０８５０】

この構成において、Ｎ末端半分のアミノ酸配列(アミノ酸１～１０２３)(ここでタンパク質は位置１にてＭｅｔマイナスである)は以下のとおりである:

【０８５１】

【化６】

DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFD
SGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDK
KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFL
IEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQ
LPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQ
YADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQL
PEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK
QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS
RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEY
FTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE
CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE
ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA
NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDE
LVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVEN
TQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTR
SDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKA
GFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQF
YKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA**K**

(配列番号 3878).

【０８５２】

この構成において、C末端半分のアミノ酸配列(アミノ酸１０２４～１３６８)(またはMetマイナスCas9中アミノ酸１０２３～１３６７として数えた)は以下のとおりである:

【０８５３】

【化７】

SEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGR
DFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF
DSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVK
KDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGS
PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQA
ENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLG
GD (配列番号 3879).

【０８５４】

例２０に示されているとおり、PE2(これは配列番号１８のSpCas9に基づく)構築物を、次のとおり、(Metマイナス配列番号１８に対して相対的に)位置１０２３/１０２４で２つの別個の構築物へと分裂した:

【０８５５】

1023/1024のN末端半分でのSpPE2分裂

【0856】

【化8】

MKRTADGSEFESPKKKRKVDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKV
LGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK
VDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKAD
LRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA
KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLS
KDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRY
DEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEK
MDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKI
EKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF
DKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFK
TNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN
EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGI
RDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANL
AGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKR
IEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDA
IVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREV
KVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIAK*CLSYETEILTVEYGLLPIGKIVEKRIECTVYSVDNNGNIYTQPVAQW*
*HDRGEQEVFEYCLEDGSLIRATKDHKFMTVDGQMLPIDEIFERELDLMRVDNLPN*SGGS
KRTADGSEFEPKKKRKV (配列番号 3875)

【0857】

【化9】

凡例 ：NLS, Cas9, 突然変異した残基, リンカー, *NpuN*インテイン, *NpuC*インテイン, **RT**

【0858】

1023/1024のC末端半分でのSpPE2分裂

【化１０－１】

MKRTADGSEFESPKKKRKV*IKIATRKYLGKQNVYDIGVERDHNFALKNGFIASN*CFNEIG
KATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLV
VAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLF
ELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVE
QHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLG
APAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD**SGGSSGGSS**
GSETPGTSESATPESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQA
WAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGIL
VPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPP
SHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKN
SPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLG
NLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQL
REFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLT
APALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPVAAG

【化１０－２】

WPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARM
THYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTD
QPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELI
ALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGWLTSEGKEIKNKDEI
LALLKALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLI
ENSSPSGGS*KRTADGSEFEPKKKRK* (　配列番号　3876)

【０８５９】

【化１１】

凡例：NLS, Cas9, 突然変異した残基, リンカー, *NpuN*インテイン, *NpuC*インテイン, **RT**

【０８６０】

本開示は、分裂インテイン多重フラッププライム編集因子を細胞に送達および/または分裂インテイン多重フラッププライム編集因子によって細胞を処置する方法をもまた企図する。

【０８６１】

いくつかの態様では、本開示はPE融合タンパク質を細胞に送達する方法を提供し:

(a)第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のN末端フラグメントをコードする第1の発現ベクターを構築すること;

(b)第2の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のC末端フラグメントをコードする第2の発現ベクターを構築すること;

(c)第1および第2の発現ベクターを細胞に送達すること、

を含み、

第1および第2の分裂インテイン配列の自己切除を引き起こすトランススプライシング活性の結果として、N末端およびC末端フラグメントは細胞内においてPE融合タンパク質として再構成される。

【０８６２】

ある態様において、第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のN末端フラグメントは、配列番号3875、または配列番号3875との少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99.9%配列同一性を有するアミノ酸配列である。

【０８６３】
他の態様において、第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のC末端フラグメントは、配列番号3876、または配列番号3876との少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99.9％配列同一性を有するアミノ酸配列である。
【０８６４】
他の態様において、本開示は、細胞内の標的DNA配列を編集する方法を提供し:
(a)第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のN末端フラグメントをコードする第1の発現ベクターを構築すること;
(b)第2の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のC末端フラグメントをコードする第2の発現ベクターを構築すること;
(c)第1および第2の発現ベクターを細胞に送達すること、
を含み、
第1および第2の分裂インテイン配列の自己切除を引き起こすトランススプライシング活性の結果として、N末端およびC末端フラグメントは細胞内においてPE融合タンパク質として再構成される。
【０８６５】
ある態様において、第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のN末端フラグメントは、配列番号3875、または配列番号3875との少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99.9％配列同一性を有するアミノ酸配列である。
【０８６６】
他の態様において、第1の分裂インテイン配列に融合されたPE融合タンパク質のC末端フラグメントは、配列番号3876、または配列番号3876との少なくとも80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも98％、または少なくとも99.9％配列同一性を有するアミノ酸配列である。
【０８６７】
PEリボヌクレオタンパク質複合体の送達
この側面では、多重フラッププライム編集因子は、エレクトロポレーションおよび脂質ナノ粒子を包含する種々の方法によって、PEgRNAと複合体化した多重フラッププライム編集因子(すなわち、PEリボヌクレオタンパク質複合体)の送達が関わる非ウイルス的送達戦略によって送達され得る。核酸の非ウイルス的送達の方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの薬剤によって増強された取り込みを包含する。リポフェクションは例えば米国特許第5,049,386号、第4,946,787号;および第4,897,355号に記載され、リポフェクション試薬は市販で販売されている(例えば、Transfectam(商標)およびLipofectin(商標))。ポリヌクレオチドの効率的な受容体認識リポフェクションにとって好適であるカチオン性および中性脂質は、FeignerのWO91/17424;WO91/16024のものを包含する。送達は細胞(例えば、in vitroのまたはex vivoの投与)または標的組織(例えばin vivoの投与)にであり得る。
【０８６８】
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号を参照)。

【０８６９】
リボヌクレオタンパク質複合体の非ウイルス的送達のためのアプローチを論ずる次の参照の追加の参照がなされ得る。これらの夫々は参照によって本願に組み込まれる。
【０８７０】
Chen,Sean,et al."Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes."Journal of Biological Chemistry(2016):jbc-M116.PubMed
【０８７１】
Zuris,John A.,et al."Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo."Nature biotechnology 33.1(2015):73.PubMed
【０８７２】
Rouet,Romain,et al."Receptor-Mediated Delivery of CRISPR-Cas9 Endonuclease for Cell-Type-Specific Gene Editing."Journal of the American Chemical Society 140.21(2018):6596-6603.PubMed.
【０８７３】
図68Cは、種々の開示されるPEリボヌクレオタンパク質複合体(高濃度のPE2、高濃度のPE3、および低濃度のPE3)がこの様式で送達され得るということを示すデータを提供する。
【０８７４】
mRNAによるPEの送達
多重フラッププライム編集に基づくゲノム編集が望まれる細胞に、多重フラッププライム編集因子および/またはPEgRNAを送達するために使用され得る別の方法は、メッセンジャーRNA(mRNA)送達方法およびテクノロジーの使用を使用することによってである。本開示に利用され得るmRNA送達方法および組成物の例は、例えばPCT/US2014/028330、US8822663B2、NZ700688A、ES2740248T3、EP2755693A4、EP2755986A4、WO2014152940A1、EP3450553B1、BR112016030852A2、およびEP3362461A1を包含する。これらの夫々はそれらの全体が参照によって本願に組み込まれる。参照によってここに組み込まれる追加の開示はKowalski et al.,"Delivering the Messenger:Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery,"Mol Therap.,2019; 27(4):710-728に見出され得る。
【０８７５】
多重フラッププライム編集因子をコードするDNAベクターとは対照的に、多重フラッププライム編集因子の送達物質としてのRNAの使用は、遺伝物質がその機能を果たすために核に入らなくてもよいという利点を有する。送達されたmRNAは細胞質において直接的に所望のタンパク質(例えば、プライム編集因子融合タンパク質)および核酸産物(例えばPEgRNA)へと翻訳され得る。しかしながら、より安定である(例えば、細胞質のRNA分解酵素に抵抗する)ためには、いくつかの態様では、送達効率を改善するためにmRNAを安定化することが必要である。ある種の送達担体、例えばカチオン性脂質またはポリマー性の送達担体は、トランスフェクションされたmRNAを内生RNase酵素から防護することをもまた助け得る。これらは、さもなければ、所望のプライム編集因子融合タンパク質をコードする治療学的なmRNAを分解し得る。加えて、修飾されたmRNAの増大した安定性にもかかわらず、治療学的レベルのタンパク質生産を許す様式でのin vivoの細胞へのmRNA、特に全長タンパク質をコードするmRNAの送達は、課題のままに留まっている。
【０８７６】
いくつかの例外はあるが、mRNAの細胞内送達は小さいオリゴヌクレオチドのものよりも一般的に難しく、それは送達ナノ粒子へのカプセル化を要求する。部分的には、他の型のRNA(低分子干渉RNA[siRNA]、～14kDa;アンチセンスオリゴヌクレオチド[ASO]、4～10kDa)と比較して、mRNA分子の有意に大きいサイズ(300～5,000kDa、～1

～15kb)を原因とする。

【０８７７】

mRNAは細胞質に達するためには細胞膜を横断しなければならない。細胞膜は細胞内送達への動的なかつ手強い関門である。それは主として双性イオン性のおよび負荷電のリン脂質の脂質二重層から作り上げられており、ここで、リン脂質の極性頭部は水性環境の方を向き、疎水性テールは疎水性コアを形成する。

【０８７８】

いくつかの態様では、本開示のmRNA組成物は、mRNA(プライム編集因子および/またはPEgRNAをコードする)、輸送基剤、および任意に標的細胞との接触と続くトランスフェクションとを容易化する薬剤を含む。

【０８７９】

いくつかの態様では、mRNAは、(例えば、mRNAの野生型のまたはネイティブなバージョンと比較して)mRNAに安定性を付与し、タンパク質の関連する異常な発現に関わる1以上の改変を包含し得る。欠陥を修正する野生型の1以上の改変もまた包含され得る。例えば、本発明の核酸は5'非翻訳領域または3'非翻訳領域の1つまたは両方の改変を包含し得る。かかる改変は、サイトメガロウイルス(CMV)最初期1(IE1)遺伝子、ポリAテール、キャップ1構造、またはヒト成長ホルモン(hGH)の部分配列をコードする配列の包含を包含し得る。いくつかの態様では、mRNAはmRNA免疫原性を縮減するように修飾される。

【０８８０】

1つの態様では、本発明の組成物中の「多重フラッププライム編集因子」mRNAは、標的細胞への送達を容易化するためにリポソーム移入基剤によって製剤され得る。企図される移入基剤は、1以上のカチオン性脂質、非カチオン性脂質、および/またはPEG修飾脂質を包含し得る。例えば、移入基剤は次のカチオン性脂質の少なくとも1つを包含し得る:C12-200、DLin-KC2-DMA、DODAP、HGT4003、ICE、HGT5000、またはHGT5001。態様では、移入基剤はコレステロール(chol)および/またはPEG修飾脂質を含む。いくつかの態様では、移入基剤はDMG-PEG2Kを含む。ある態様において、移入基剤は次の脂質製剤を有する:C12-200、DOPE、chol、DMG-PEG2K;DODAP、DOPE、コレステロール、DMG-PEG2K;HGT5000、DOPE、chol、DMG-PEG2K、HGT5001、DOPE、chol、DMG-PEG2Kの1つ。

【０８８１】

本開示は、1以上のPEをコードするmRNA分子による標的細胞のトランスフェクションを容易化することにとって有用な組成物および方法をもまた提供する。例えば、本発明の組成物および方法は、1以上の標的細胞に対する組成物の親和性を増大させ得る標的化リガンドの使用を企図する。1つの態様では、標的化リガンドはアポリポタンパク質Bまたはアポリポタンパク質Eであり、対応する標的細胞は低密度リポタンパク質受容体を発現し、それゆえに標的化リガンドの認識を促進する。膨大な数の標的細胞が本開示の方法および組成物を用いて選好的に標的化され得る。例えば、企図される標的細胞は、肝細胞、上皮細胞、造血細胞、上皮細胞、内皮細胞、肺細胞、骨細胞、幹細胞、間葉系細胞、神経細胞、心臓細胞、脂肪細胞、血管平滑筋包含(Includes)細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、ベータ細胞、下垂体細胞、滑膜表層細胞、卵巣細胞、精巣細胞、線維芽細胞、B細胞、T細胞、網赤血球、白血球、顆粒球、および腫瘍細胞を包含する。しかしながら、それはこれらに限定されない。

【０８８２】

いくつかの態様では、PEをコードするmRNAは、任意に、例えばかかるmRNAの安定性および/もしくは半減期を改善するかまたはタンパク質生産を改善もしくは別様に容易化する化学的または生物学的修飾を有し得る。トランスフェクションによって、本発明の組成物中の天然のmRNAは30分および何日かの間の半減期で崩壊し得る。本開示の組成物中のmRNAは翻訳される少なくともいくらかの能力を保持し得、それによって機能的なタンパク質または酵素を生ずる。従って、本発明は、安定化されたmRNAを含む組成

物およびそれを投与する方法を提供する。いくつかの態様では、mRNAの活性は伸長された期間に渡って遷延する。例えば、本開示の組成物が半週毎もしくは隔週毎の基準で、またはより好ましくは毎月、隔月毎、四半期毎、もしくは毎年の基準で対象に投与されるようにして、mRNAの活性は遷延し得る。本発明のmRNAの伸長または遷延した活性は、かかるmRNAから生ずるタンパク質または酵素の数量に直接的に関係する。類似に、本開示の組成物の活性は、mRNAの翻訳を改善または増強するためになされる改変によってさらに伸長または遷延し得る。さらにその上、標的細胞によって生ずる機能的なタンパク質または酵素の数量は、標的細胞に送達されるmRNAの数量およびかかるmRNAの安定性の関数である。本発明のmRNAの安定性が改善または増強され得る程度に合わせて、半減期、生ずるタンパク質または酵素の活性、および組成物の投薬頻度はさらに伸長され得る。

【０８８３】

従って、いくつかの態様では、本開示の組成物中のmRNAは、例えばin vivoのヌクレアーゼ消化に対する改善された耐性を包含する増大または増強された安定性を核酸に付与する少なくとも1つの改変を含む。本願において用いられる用語「改変」および「改変される」は、かかる用語が本願において提供される核酸に関すると、好ましくは安定性を増強し、mRNAの野生型または天然に存在するバージョンよりもmRNAを安定に(例えば、ヌクレアーゼ消化に対して耐性に)する少なくとも1つの変改を包含する。本願において用いられる用語「安定」および「安定性」は、かかる用語が特にmRNAについて本発明の核酸に関すると、例えば正常ではかかるmRNAを分解することができるヌクレアーゼ(すなわち、エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼ)による分解に対する増大または増強した耐性を言う。増大した安定性は、例えば、標的細胞または組織内の内生酵素(例えば、エンドヌクレアーゼもしくはエキソヌクレアーゼ)または条件による加水分解または他の破壊に対するより少ない感度を包含し得、それによって、標的細胞、組織、対象、および/または細胞質におけるかかるmRNAの滞留を増大または増強する。本願において提供される安定化されたmRNA分子は、それらの天然に存在する未改変のカウンターパート(例えば、mRNAの野生型バージョン)に対して相対的に、長い半減期を実証する。また、かかる用語が本発明のmRNAに関係すると、用語「改変」および「改変される」によって、mRNA核酸の翻訳を改善または増強する変改が企図される。例えば、タンパク質翻訳の開始に機能する配列(例えば、Kozakコンセンサス配列)の包含を包含する。(Kozak,M.,Nucleic Acids Res 15(20):8125-48(1987))。

【０８８４】

いくつかの態様では、本開示の組成物に用いられるmRNAは、それらをより安定にするための化学的または生物学的修飾を経過している。mRNAの例示の修飾は、塩基の枯渇(例えば、1つのヌクレオチドの欠失もしくは別のものへの置換による)または塩基の修飾、例えば塩基の化学修飾を包含する。本願において用いられる言い回し「化学修飾」は、天然に存在するmRNAに見られるものとは異なるケミストリーを導入する修飾、例えば共有結合的修飾、例えば修飾ヌクレオチドの導入(例えば、ヌクレオチドアナログ、またはかかるmRNA分子に天然には見出されないペンダント基の包含)を包含する。

【０８８５】

本開示の組成物に用いられるPEをコードするmRNAに組み込まれ得る他の好適なポリヌクレオチド修飾は、4'-チオ修飾塩基:4'-チオアデノシン、4'-チオグアノシン、4'-チオシチジン、4'-チオウリジン、4'-チオ-5-メチル-シチジン、4'-チオシュードウリジン、および4'-チオ2-チオウリジン、ピリジン-4-オンリボヌクレオシド、5-アザ-ウリジン、2-チオ-5-アザ-ウリジン、2-チオウリジン、4-チオシュードウリジン、2-チオシュードウリジン、5-ヒドロキシウリジン、3-メチルウリジン、5-カルボキシメチル-ウリジン、1-カルボキシメチル-シュードウリジン、5-プロピニルウリジン、1-プロピニルシュードウリジン、5-タウリノメチルウリジン、1-タウリノメチル-シュードウリジン、5-タウリノメチル-2-チオウリジン、1-タウリノメチル-4-チオウリジン、5-メチル-ウリジン、1-メチル-シュードウリジン、4-チオ-1-メチル-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-シ

ュードウリジン、1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、2-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードウリジン、ジヒドロウリジン、ジヒドロシュードウリジン、2-チオジヒドロウリジン、2-チオジヒドロシュードウリジン、2-メトキシウリジン、2-メトキシ-4-チオウリジン、4-メトキシ-シュードウリジン、4-メトキシ-2-チオシュードウリジン、5-アザ-シチジン、シュードイソシチジン、3-メチル-シチジン、N4-アセチルシチジン、5-ホルミルシチジン、N4-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシチジン、1-メチル-シュードイソシチジン、ピロロ-シチジン、ピロロ-シュードイソシチジン、2-チオシチジン、2-チオ-5-メチル-シチジン、4-チオシュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-シュードイソシチジン、4-チオ-1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、1-メチル-1-デアザ-シュードイソシチジン、ゼブラリン、5-アザ-ゼブラリン、5-メチルゼブラリン、5-アザ-2-チオゼブラリン、2-チオゼブラリン、2-メトキシ-シチジン、2-メトキシ-5-メチル-シチジン、4-メトキシ-シュードイソシチジン、4-メトキシ-1-メチル-シュードイソシチジン、2-アミノプリン、2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-アデニン、7-デアザ-8-アザ-アデニン、7-デアザ-2-アミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2-アミノプリン、7-デアザ-2,6-ジアミノプリン、7-デアザ-8-アザ-2,6-ジアミノプリン、1-メチルアデノシン、N6-メチルアデノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、2-メチルチオ-N6-(シス-ヒドロキシイソペンテニル)アデノシン、N6-グリシニルカルバモイルアデノシン、N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、2-メチルチオ-N6-スレオニルカルバモイルアデノシン、N6,N6-ジメチルアデノシン、7-メチルアデニン、2-メチルチオアデニン、および2-メトキシ-アデニン、イノシン、1-メチル-イノシン、ワイオシン、ワイブトシン、7-デアザ-グアノシン、7-デアザ-8-アザ-グアノシン、6-チオグアノシン、6-チオ-7-デアザ-グアノシン、6-チオ-7-デアザ-8-アザ-グアノシン、7-メチル-グアノシン、6-チオ-7-メチル-グアノシン、7-メチルイノシン、6-メトキシ-グアノシン、1-メチルグアノシン、sN2-メチルグアノシン、N2,N2-ジメチルグアノシン、8-オキソ-グアノシン、7-メチル-8-オキソ-グアノシン、1-メチル-6-チオグアノシン、N2-メチル-6-チオグアノシン、およびN2,N2-ジメチル-6-チオグアノシン、ならびにそれらの組み合わせを包含するが、これらに限定されない。用語修飾は、例えば、本発明のmRNA配列上への非ヌクレオチド連結部または修飾ヌクレオチドの組み込みをもまた包含する(例えば、機能的なタンパク質または酵素をコードするmRNA分子の3'および5'端の1つまたは両方の修飾)。かかる修飾は、mRNA配列への塩基の追加(例えば、ポリAテールまたはより長いポリAテールの包含)、3'UTRまたは5'UTRの変改、mRNAを薬剤(例えば、タンパク質または相補的な核酸分子)と複合体化すること、mRNA分子の構造を変化させるエレメント(例えば、これは二次構造を形成する)の包含を包含する。

【０８８６】

いくつかの態様では、PEをコードするmRNAは5'キャップ構造を包含する。5'キャップは典型的には次のとおり追加される:第1に、RNA末端ホスファターゼが末端リン酸基の1つを5'ヌクレオチドから除去し、2つの末端リン酸を残す;次いで、グアノシン三リン酸(GTP)がグアニリルトランスフェラーゼによって末端リン酸に追加され、5'5'5三リン酸連結部を生ずる;次いで、グアニンの7-窒素がメチルトランスフェラーゼによってメチル化される。キャップ構造の例は、m7G(5')ppp(5'(A、G(5')ppp(5')A、およびG(5')ppp(5')Gを包含するが、これらに限定されない。天然に存在するキャップ構造は、三リン酸ブリッジを介して最初に転写されるヌクレオチドの5'端に連結されている7-メチルグアノシンを含み、m7G(5')ppp(5')Nのジヌクレオチドキャップをもたらし、Nはいずれかのヌクレオシドである。in vivoでは、キャップは酵素的に追加される。キャップは核内で追加され、酵素グアニリルトランスフェラーゼによって触媒される。RNAの5'末端の端へのキャップの追加は転写の開始後に直ちに生起する。末端ヌクレオシドは典型的にはグアノシンであり、全ての他のヌクレオチドとは逆向き、すなわちG(5')ppp(5')GpNpNpである。

【０８８７】

追加のキャップアナログは、m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC;非メチル化キャップアナログ(例えばGpppG);ジメチル化キャップアナログ(例えばm2,7GpppG)、トリメチル化キャップアナログ(例えば、m2,2,7GpppG)、ジメチル化対称キャップアナログ(例えば、m7Gpppm7G)、またはアンチリバースキャップアナログ(例えば、ARCA;m7,2'OmeGpppG、m72'dGpppG、m7,3'OmeGpppG、m7,3'dGpppG、およびそれらの四リン酸誘導体)からなる群から選択される化学構造を包含するが、これらに限定されない(例えば、Jemielity,J.et al.,"Novel 'anti-reverse'cap analogs with superior translational properties",RNA,9:1108-1122(2003)を見よ)。

【０８８８】

典型的には、「テール」の存在はエキソヌクレアーゼ分解からmRNAを防護するための用をなす。ポリAまたはポリUテールは天然のメッセンジャーおよび合成センスRNAを安定化すると考えられる。よって、ある態様において、長いポリAまたはポリUテールがmRNA分子に追加され得、それゆえにRNAをより安定にする。ポリAまたはポリUテールは種々の当該技術分野で認識される技術を用いて追加され得る。例えば、長いポリAテールは、ポリAポリメラーゼを用いて合成のまたはin vitro転写されたRNAに追加され得る(Yokoe,et al.Nature Biotechnology.1996;14:1252-1256)。転写ベクターもまた長いポリAテールをコードし得る。加えて、ポリAテールは直接的にPCR産物からの転写によって追加され得る。ポリAはRNAリガーゼによってもまたセンスRNAの3’端にライゲーションされ得る(例えば、SambrookおよびFritschおよびManiatisによるMolecular Cloning A Laboratory Manual,2nd Ed.,ed.(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1991 edition)を見よ)。

【０８８９】

典型的には、ポリAまたはポリUテールの長さは少なくとも約10、50、100、200、300、400、少なくとも500ヌクレオチドであり得る。いくつかの態様では、mRNAの3'末端のポリAテールは典型的には約10～300アデノシンヌクレオチドを包含する(例えば、約10～200アデノシンヌクレオチド、約10～150アデノシンヌクレオチド、約10～100アデノシンヌクレオチド、約20～70アデノシンヌクレオチド、または約20～60アデノシンヌクレオチド)。いくつかの態様では、mRNAは3'ポリCテール構造を包含する。mRNAの3'末端の好適なポリCテールは典型的には約10～200シトシンヌクレオチドを包含する(例えば、約10～150シトシンヌクレオチド、約10～100シトシンヌクレオチド、約20～70シトシンヌクレオチド、約20～60シトシンヌクレオチド、または約10～40シトシンヌクレオチド)。ポリCテールはポリAまたはポリUテールに追加され得るか、あるいはポリAまたはポリUテールを置換し得る。

【０８９０】

本開示に従うPEをコードするmRNAは種々の公知の方法のいずれかに従って合成され得る。例えば、本発明に従うmRNAはin vitro転写(IVT)によって合成され得る。手短かには、IVTは、典型的には、プロモーターを含有する直線状または環状DNA鋳型、リボヌクレオチド三リン酸のプール、DTTおよびマグネシウムイオンを包含し得る緩衝液系、ならびに適当なRNAポリメラーゼ(例えば、T3、T7、またはSP6 RNAポリメラーゼ)、DNAse I、ピロホスファターゼ、および/またはRNAse阻害剤によって行われる。厳密な条件は特定の適用に従って変わるであろう。

【０８９１】

mRNA送達が関わる態様では、PE融合タンパク質をコードするmRNA対PEgRNAの比は効率的な編集にとって重要であり得る。ある態様において、mRNA(PE融合タンパク質をコードする)対PEgRNAの重量比は1:1である。ある種の他の態様において、mRNA(PE融合タンパク質をコードする)対PEgRNAの重量比は2:1である。なお他の態様において、mRNA(PE融合タンパク質をコードする)対PEgRNAの重量比は1:2である。なおさらなる態様では、mRNA(PE融合タンパク質をコードする)対PEgRNAの重量比は、約1:1000、1:900;1:800;1:700;1:600;1:500;1:400;1:300;1:200;1:100;1:90;1:80;1:70;1:60;1:50;1:40;1:30;1:20;1:10;および1:1からなる群から選択される。

他の態様において、mRNA(PE融合タンパク質をコードする)対PEgRNAの重量比は、約1:1000、1:900;800:1;700:1;600:1;500:1;400:1;300:1;200:1;100:1;90:1;80:1;70:1;60:1;50:1;40:1;30:1;20:1;10:1;および1:1からなる群から選択される。

【0892】

F．誘導可能な二量体化ドメインの挿入のためのプライム編集の使用

本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子は(図90、95、97A、98Aによって表されるとおり)、二量体化ドメインを1以上のタンパク質標的に組み入れるためにもまた用いられ得る。二量体化ドメインは、二重特異的な様式で結合する連結部分(例えば、低分子、ペプチド、またはタンパク質)を介する1以上のタンパク質標的の二量体化に関連する活性の誘導可能な制御を容易化し得る。種々の側面では、二量体化ドメインは、異なるタンパク質(例えば、同じ型または異なるタンパク質)上に組み入れされるときに、夫々が同じ二重特異性部分(例えば、別個に二量体化ドメインに結合する少なくとも(at least)2つの領域を有する二重特異性低分子、ペプチド、またはポリペプチド)に結合し、それによって、二重特異性リガンドに対するそれらの共通の相互作用によってタンパク質の二量体化を引き起こす。この様式で、二重特異性リガンドは2つのタンパク質の二量体化の「誘導因子」として機能する。いくつかのケースでは、二重特異性リガンドまたは化合物は、同じである2つの標的化部分を有するであろう。他の態様において、二重特異性リガンドまたは化合物は夫々が他とは異なる標的化部分を有するであろう。同じ2つの標的化部分を有する二重特異性リガンドまたは化合物は、異なるタンパク質標的上に組み入れされた同じ二量体化ドメインを標的化する能力があるであろう。異なる標的化部分を有する二重特異性リガンドまたは化合物は、異なるタンパク質標的上に組み入れされた異なる二量体化ドメインを標的化する能力があるであろう。

【0893】

本願において用いられる用語「二量体化ドメイン」は、二重特異性リガンドの結合部分に結合するリガンド結合ドメインを言う。「第1の」二量体化ドメインは二重特異性リガンドの第1の結合部分に結合し、「第2の」二量体化ドメインは同じ二重特異性リガンドの第2の結合部分に結合する。第1の二量体化ドメインが第1のタンパク質に融合され(例えば、本願において論じられるとおりPEによる)、かつ第2の二量体化ドメイン(例えば、本願において論じられるとおりPEによる)が第2のタンパク質に融合されるときには、第1および第2のタンパク質は二重特異性リガンドの存在下において二量体化し、二重特異性リガンドは、第1の二量体化ドメインに結合する少なくとも1つの部分と第2の二量体化ドメインに結合する少なくとも別の部分とを有する。

【0894】

本願において用いられる用語「二重特異性リガンド」または「二重特異性部分」は、2つの異なるリガンド結合ドメインに結合するリガンドを言う。種々の態様においては、二重特異性部分はそれ自体が2つの同じまたは2つの異なる化学的部分の二量体であり、各部分は二量体化ドメインに特異的にかつきつく結合する。ある態様において、リガンドは低分子化合物またはペプチドまたはポリペプチドである。他の態様において、リガンド結合ドメインはペプチドタグとしてタンパク質上に組み入れられ得る「二量体化ドメイン」である。種々の態様においては、同じかまたは異なる二量体化ドメインを夫々が含む2つのタンパク質が、二重特異性リガンドに対する各二量体化ドメインの結合によって二量体化するように誘導され得る。それらの分子は「二量体化の化学的誘導因子」またはCIDともまた言われ得る。加えて、二重特異性リガンドは、(例えば、標準化された化学的連結部によって)2つの同じ部分を一緒にまたは2つの異なる部分を一緒にカップリングすることによって調製され得、各部分は二量体化ドメインにきつくかつ特異的に結合する。

【0895】

種々の側面では、多重フラップPEによって組み入れされる二量体化ドメイン同士は同じかまたは異なり得る。

【0896】

例えば、二量体化ドメインはFKBP12であり得る。これは次のアミノ酸配列を有する:

【表４７】

FKBP12	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLE DGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGV AQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATL VFDVELLKLE(配列番号488)

【０８９７】

別の例では、二量体化ドメインは、FKBP12-F36Vと言われるFKBP12の変異体、合成バンプFK506ミミックに結合する操作された穴を有するFKBP12の変異体であり得る(2、図3)[107]:

【表４８】

FKBP12-F36V	MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLED GKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQ MSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFD VELLKLE(配列番号489)

【０８９８】

別の例では、二量体化ドメインは次のとおりシクロフィリンであり得る:

【表４９】

シクロフィリン	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTA ENFRALSTGEKGFGYKGSCFHRIIPGFMCQGGD FTRHNGTGGKSIYGEKFEDENFILKHTGPGILSM ANAGPNTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGKV KEGMNIVEAMERFGSRNGKTSKKITIADCGQLE (配列番号490)

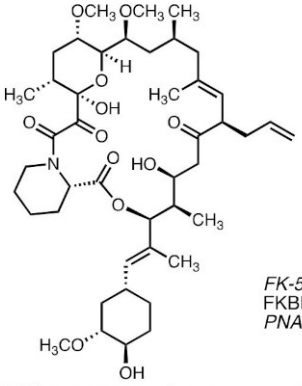
【０８９９】

種々の態様において、これらの二量体化ドメインのアミノ酸配列は、ネイティブな標的に対する結合を最適化するかまたは結合直交性を改善するために変改され得る。低分子結合タンパク質をコードする遺伝子の核酸配列は、例えばPEgRNA二次構造を縮減することによってPEプロセスの効率を最適化するために変改され得る。

【０９００】

好適な二量体化ドメインおよびそれに結合する対応する低分子化合物の他の例は次のとおり提供される。2つの二量体化ドメインに結合し得る二重特異性リガンドを形成するためには、対応する低分子化合物は第2の低分子化合物(同じ化合物または異なる化合物どちらか)に(例えば、化学的リンカーによって)カップリングされ得るということに注意せよ。FK506およびシクロスポリンAなどのいくつかのケースでは、夫々の二量体化(例えば、FK506-FK506またはシクロスポリンA-シクロスポリンA)はモノマー化合物の免疫抑制活性を縮減または消去する。

【表５０－１】

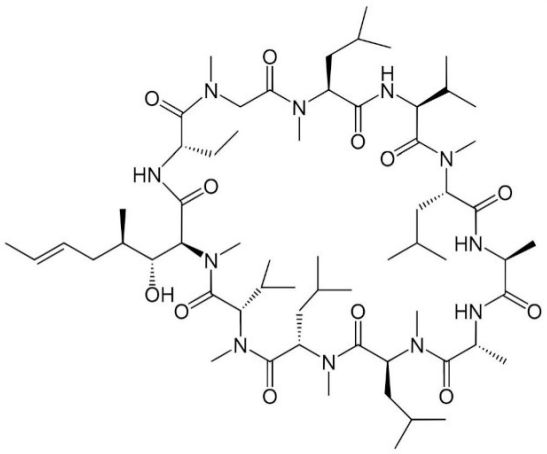
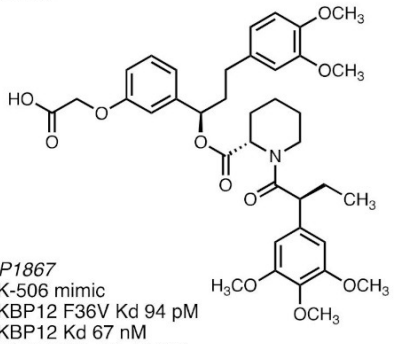
<table>
<tr><td>低分子－二量体化ドメインへ結合する－これら分子の二量体は、2つの二量体化ドメインに結合する二重特異性リガンドを構成する</td><td>二量体化ドメイン(単数または複数)</td></tr>
<tr><td>FK506


FK-506
FKBP12 Kd 0.4 nM
PNAS 1990, 87, 9231.
標的:FKBP12+カルシニューリン</td><td>FKBP12 のアミノ酸配列:

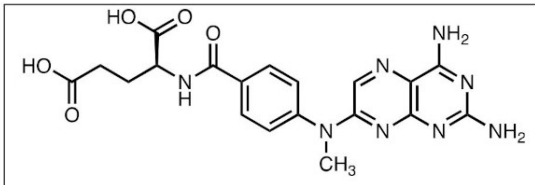
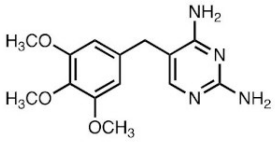
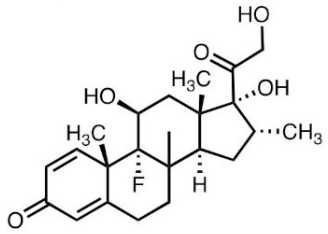
MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML
EDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEE
GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH
ATLVFDVELLKLE(配列番号491)

カルシニューリン:</td></tr>
<tr><td>シクロスポリン A</td><td>ヒトシクロスポリ A のアミノ酸配列:</td></tr>
</table>

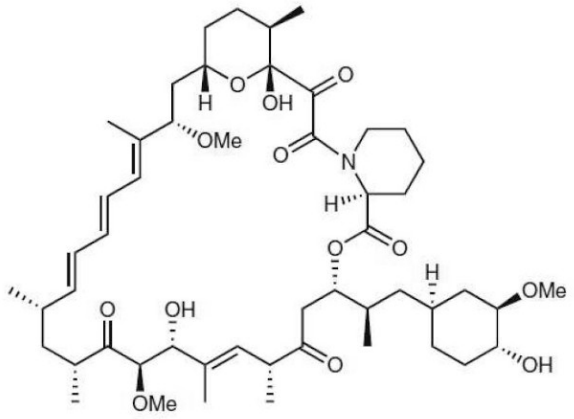
【表５０－２】

 標的:シクロフィリン+カルシニューリン	MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKV PKTAENFRALSTGEKGFGYKGSCFHRIIPG FMCQGGDFTRHNGTGGKSIYGEKFEDEN FILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQFFICTA KTEWLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMER FGSRNGKTSKKITIADCGQLE（配列番号490） ヒトシクロフィリン B のアミノ酸配列: MLRLSERNMKVLLAAALIAGSVFFLLLPG PSAADEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV GRVIFGLFGKTVPKTVDNFVALATGEKGF GYKNSKFHRVIKDFMIQGGDFTRGDGTG GKSIYGERFPDENFKLKHYGPGWVSMAN AGKDTNGSQFFITTVKTAWLDGKHVVFG KVLEGMEVVRKVESTKTDSRDKPLKDVII ADCGKIEVEKPFAIAKE（配列番号493） マウスシクロフィリン C のアミノ酸配列: MSPGPRLLLPAVLCLGLGALVSSSGSSGVR KRGPSVTDKVFFDVRIGDKDVGRIVIGLF GNVVPKTVENFVALATGEKGYGYKGSIFH RVIKDFMIQGGDFTARDGTGGMSIYGETF PDENFKLKHYGIGWVSMANAGPDTNGSQ FFITLTKPTWLDGKHVVFGKVLDGMTVV HSIELQATDGHDRPLTDCTIVNSGKIDVKT PFVVEVPDW（配列番号494）
AP1867  *AP1867* FK-506 mimic FKBP12 F36V Kd 94 pM FKBP12 Kd 67 nM *PNAS* **1998**, *95*, 10437. 標的(単数または複数):FKBP12	FKBP12-F36V のアミノ酸配列: MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML EDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEE GVAQMSVGQRAKLT ISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE （配列番号495）
メトトレキサート	ヒトジヒドロ葉酸レダクターゼのアミノ酸配列: MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNE FRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPE KNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLD DALKLTEQPELANKVDMVWIVGGSSVYKEA MNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKY KLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND （配列番号496）

【表５０－３】

 *methotrexate* Human DHFR Kd < 10 nM *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10304. *E. coli* DHFR Kd 9.5 nM *PNAS* **2002**, *99*, 13481. 標的(単数または複数):ジヒドロ葉酸レダクターゼ	
トリメトプリム  *trimethoprim* *E. coli* DHFR K_I 1.3 nM *Biochemistry* **1982**, *21*, 5068. 標的(単数または複数):ジヒドロ葉酸レダクターゼ	E.COLI ジヒドロ葉酸レダクターゼのアミノ酸配列: MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWF KRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRKNIILSS QPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIG GGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAEVEGDTHFPD YEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR （配列番号497）
デキサメタゾン  *dexamethasone* Human GR Kd 4.6 nM *Mol. Endocrin.* **1999**, *13*, 1855.	ヒトグルココルチコイド受容体のアミノ酸配列: MDSKESLTPGREENPSSVLAQERGDVMDFYK TLRGGATVKVSASSPSLAVASQSDSKQRRLLV DFPKGSVSNAQQPDLSKAVSLSMGLYMGETE TKVMGNDLGFPQQGQISLSSGETDLKLLEESI ANLNRSTSVPENPKSSASTAVSAAPTEKEF PKTHSDVSSEQQHLKGQTGTNGGNVKLYTTD QSTFDILQDLEFSSGSPGKETNESPWRSDLLID ENCLLSPLAGEDDSFLLEGNSNEDCKPLILPDT KPKIKDNGDLVLSSPSNVTLPQVKTEKEDFIEL CTPGVIKQEKLGTVYCQASFPGANIIGNKMSA ISVHGVSTSGGQMYHYDMNTASLSQQQDQKP IFNVIPPIPVGSENWNRCQGSGDDNLTSLGTLN FPGRTVFSNGYSSPSMRPDVSSPPSSSSTATTGP PPKLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSCKVFFKRA VEGQHNYLCAGRNDCIIDKIRRKNCPACRYRK CLQAGMNLEARKTKKKIKGIQQATTGVSQET SENPGNKTIVPATLPQLTPTLVSLLEVIEPEVLY AGYDSSVPDSTWRIMTTLNMLGGRQVIAAVK WAKAIPGFRNLHLDDQMTLLQYSWMFLMAF ALGWRSYRQSSANLLCFAPDLIINEQRMTLPC MYDQCKHMLYVSSELHRLQVSYEEYLCMKT LLLLSSVPKDGLKSQELFDEIRMTYIKELGKAI VKREGNSSQNWQRFYQLTKLLDSMHEVVEN LLNYCFQTFLDKTMSIEFPEMLAEIITNQIPKY SNGNIKKLLFHQK（配列番号498）

【表５０－４】

 ラパマイシン	FKBP12 のアミノ酸配列: MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGML EDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEE GVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPH ATLVFDVELLKLE（配列番号491）

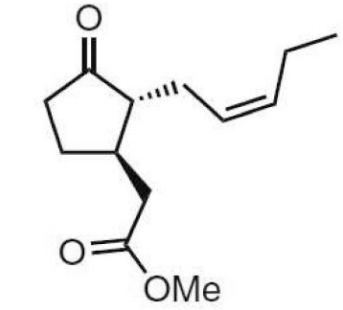
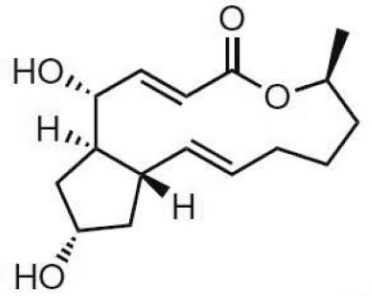
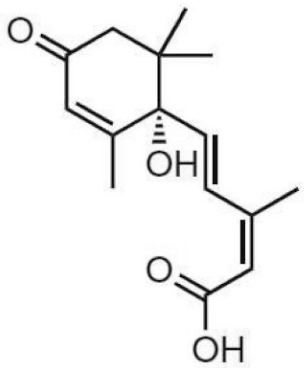
【０９０１】

天然に存在する二機能性分子およびそれらの二元的な標的受容体の他の例は次のとおりである。プライム編集は、二元的な標的受容体を異なるタンパク質に組み入れるために用いられ得る。ひとたび異なるタンパク質が二機能性分子受容体を含有するようにPEによって改変されると、二機能性分子は導入され得、それによって、異なる二量体化ドメインを含むように改変されたタンパク質の二量体化を引き起こす。(1)二機能性(biofunctional)分子および(2)それらの二元的な標的受容体のペアリングの例は次のとおりである:

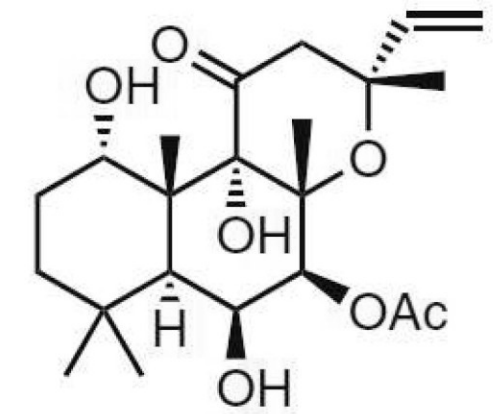
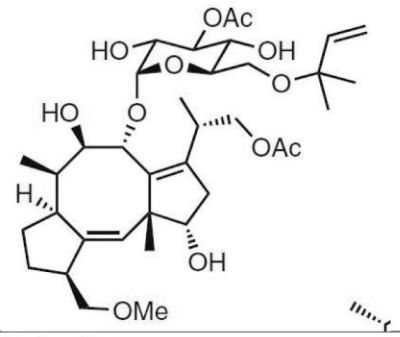
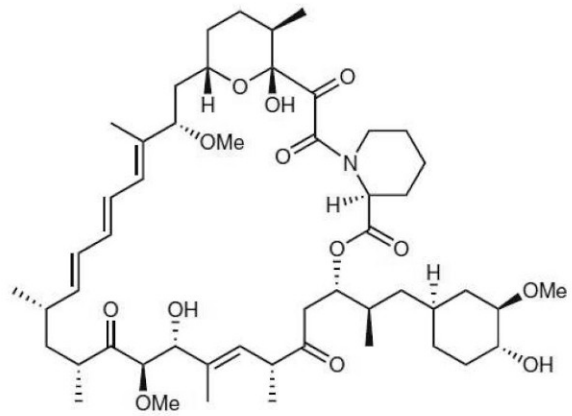
【表５１－１】

天然に存在する二機能性分子	二機能性分子の標的受容体
 オーキシン	標的受容体 1:オーキシン受容体 標的受容体 2:TIR1 E3 リガーゼ

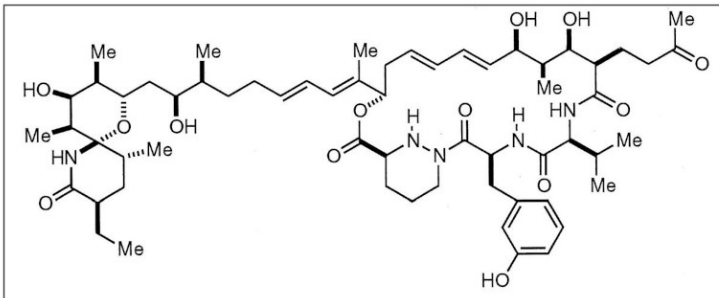
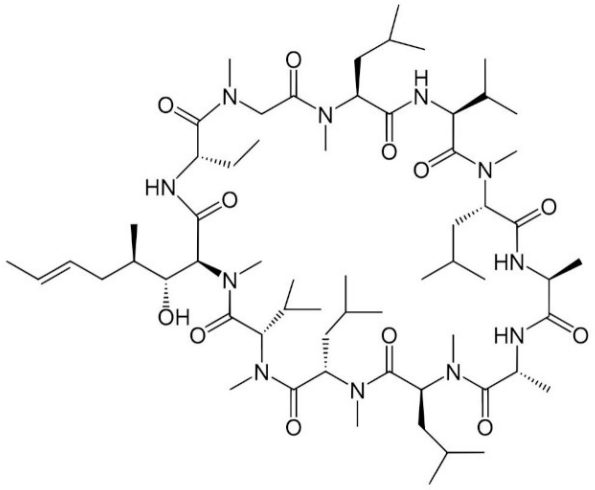
【表５１－２】

 ジャスモン酸メチル	標的受容体 1:JAZ 受容体 標的受容体 2:Col1 E3 リガーゼ
ブレフェルジン A 	標的受容体 1:GBF1 標的受容体 2:GTPase Arf1p
アブシジン酸 	標的受容体 1:PYR 受容体 標的受容体 2:リンタンパク質ホスファターゼ 2C
フォルスコリン	標的受容体 1:アデニリルシクラーゼ単量体 標的受容体 2:アデニリルシクラーゼ単量体

【表５２－１】

	
フシコクシン A 	標的受容体 1:14-3-3 タンパク質 標的受容体 2:H^+-ATPase
ラパマイシン 	標的受容体 1:FKBP12 標的受容体 2:mTOR
サングリフェリン A	標的受容体 1:シクロフィリン 標的受容体 2:IMP デヒドロゲナーゼ 2

【表５２－２】

 Sanglifehrin A (SFA)	
シクロスポリン A 	標的受容体 1:シクロフィリン 標的受容体 2:カルシニューリン

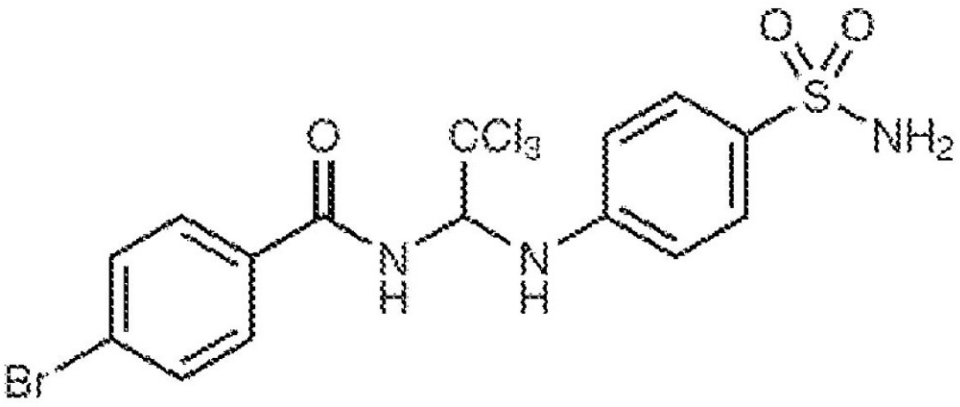
【０９０２】

プライム編集のこの側面で使用され得る他の二機能性分子の例は以下のとおりである:

【０９０３】

Synstab A:

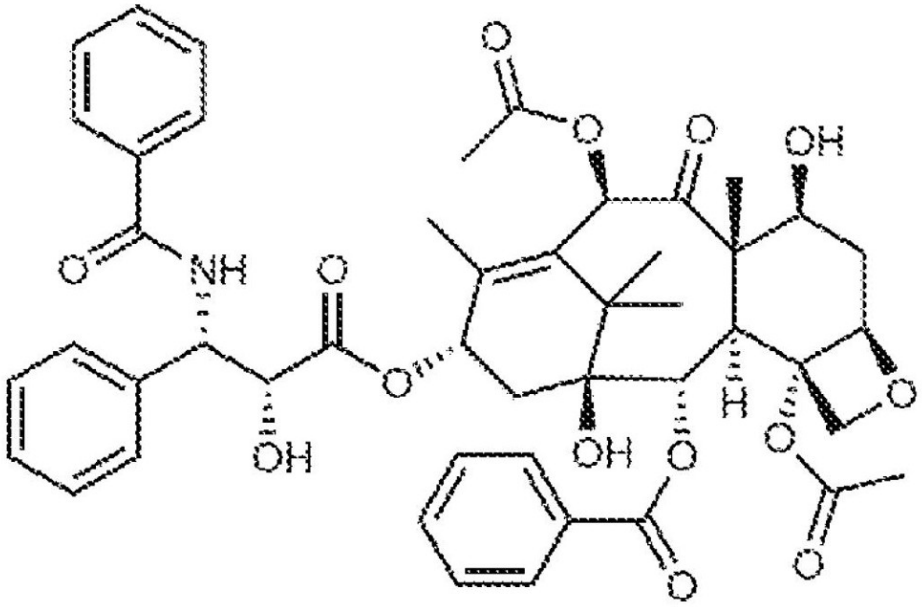
【化１２】



【０９０４】

パクリタキセル:

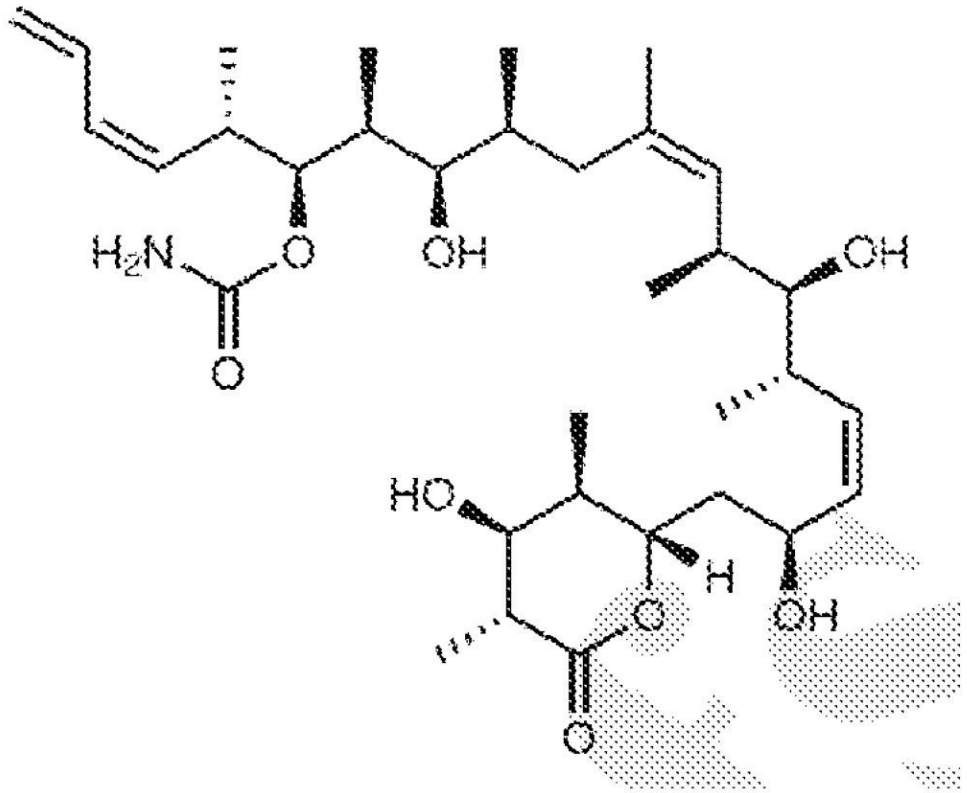
【化１３】



【０９０５】

ディスコデルモリド:

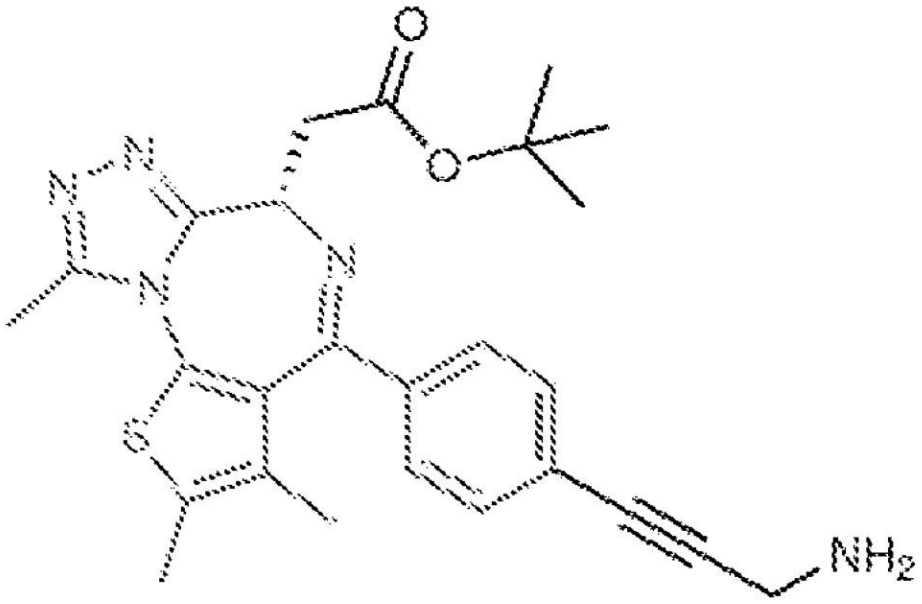
【化１４】



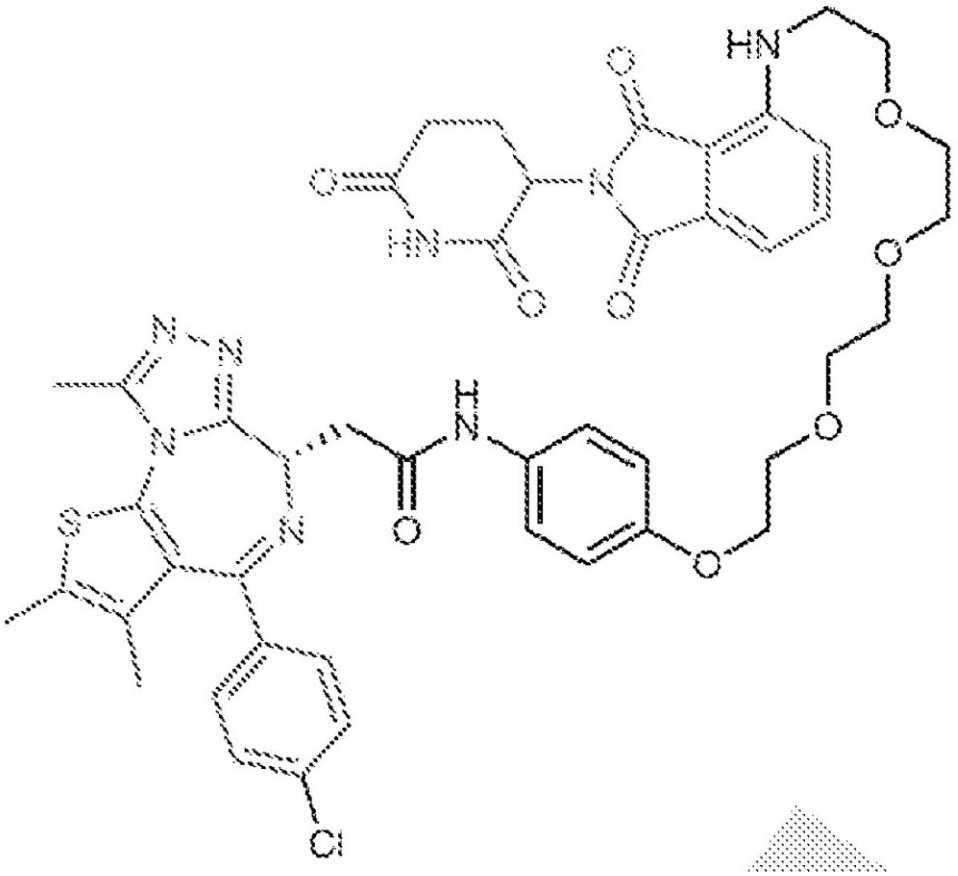
【０９０６】

GNE-0011

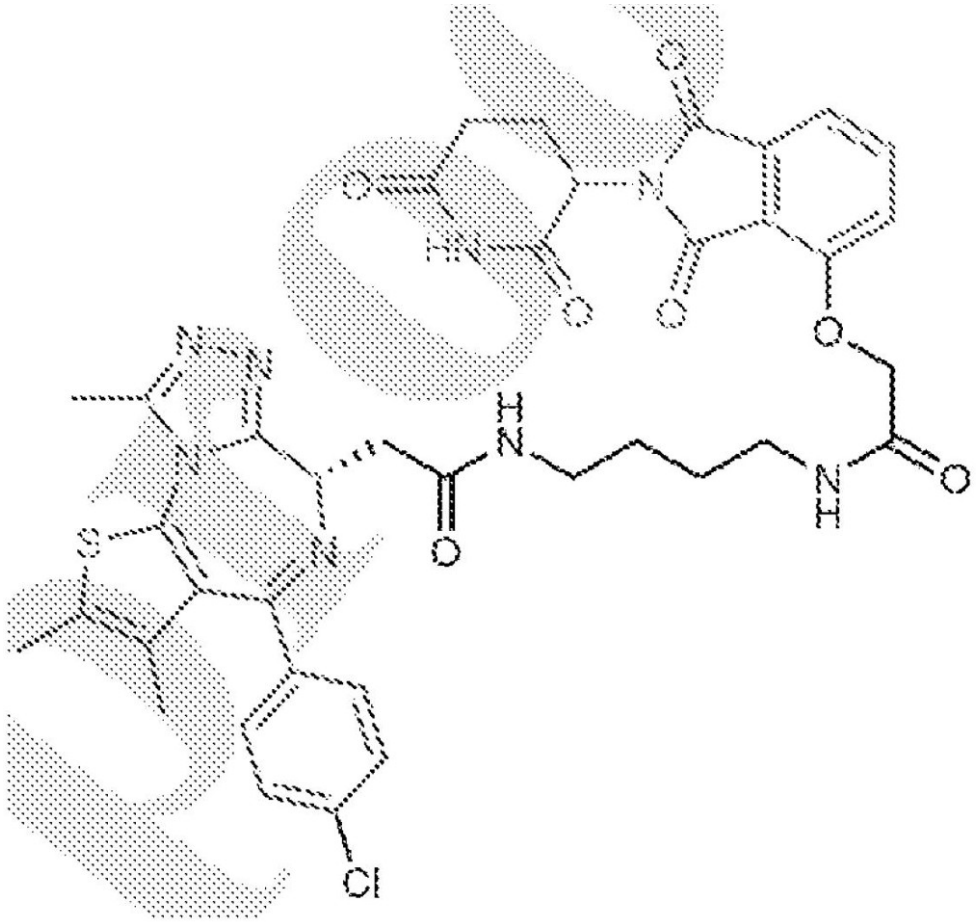
【化１５】



【０９０７】
ＡＲＶ-８２５、および
【化１６】



【０９０８】
ｄＢＥＴ１
【化１７】



。

【０９０９】
Ｓｙｎｓｔａｂ Ａ、パクリテキセル、およびディスコデルモライドは微小管安定化剤である。それゆえに、これらの化合物は、微小管タンパク質を含むようにＰＥによって改変されたタンパク質同士を二量体化するために用いられ得る。ＧＮＥ-００１１、ＡＲＶ-８２５、およびｄＢＥＴ１はＢＲＤ４結合モチーフおよびＣＲＢＮ結合モチーフを含む。それゆえに、これらの化合物は、これらの標的化ドメインを含むようにＰＥによって改変されたタンパク質同士を二量体化するために用いられ得る。

【０９１０】
二量体化ドメインを組み入れるためのＰＥｇＲＮＡは次の構造を含み得る(図３Ｄの参照による):
５'-[スペーサー]-[ｇＲＮＡコア]-[伸長アーム]-３'であって、伸長アームは５'-[相同アーム]-[編集鋳型]-[プライマー結合部位]-３'を含む;または
５'-[伸長アーム]-[スペーサー]-[ｇＲＮＡコア]-３'であって、伸長アームは５'-[相同アーム]-[編集鋳型]-[プライマー結合部位]-３'を含み、どちらの構成でも「編集鋳型」は二量体化ドメインのヌクレオチド配列を含む。

【０９１１】
１つの例では、ヒトインスリン受容体のＣ末端の端におけるＦＫＢＰ１２二量体化ドメインの挿入のためのＰＥｇＲＮＡ(スペーサーは下線付き、ｇＲＮＡコアはプレーン、フラップ相同性は太字、ＦＫＢＰ１２挿入はイタリック、アニーリング領域は太字イタリック):

【表５３－１】

ヒトインスリン受容体にFKBP12を組み入れるための PEGRNA	CACGGUAGGCACUGUUAGGAGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGC**UUGCCUCGGUCCAAUCCUUCC***GGA* *GUGCAGGUGGAAACCAUCUCCCCAGGAGACG* *GGCGCACCUUCCCCAAGCGCGGCCAGACCUG* *CGUGGUGCACUACACCGGGAUGCUUGAAGAU* *GGAAAGAAAUUUGAUUCCUCCCGGGACAGAAA* *CAAGCCCUUUAAGUUUAUGCUAGGCAAGCAG* *GAGGUGAUCCGAGGCUGGGAAGAAGGGGUUG* *CCCAGAUGAGUGUGGGUCAGAGAGCCAAACU*

【表５３－２】

	GACUAUAUCUCCAGAUUAUGCCUAUGGUGCC *ACUGGGCACCCAGGCAUCAUCCCACCACAUGC* *CACUCUCGUCUUCGAUGUGGAGCUUCUAAAA* *CUGGAA**UAACAGUGCCUACC*** (配列番号499)

【０９１２】

別の例では、(最適化のための)HEK3遺伝子座におけるFKBP12二量体化ドメインの挿入のためのPEgRNA:

【表５４】

HEK3にFKBP12を組み入れるための PEGRNA	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGG TGCTGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGC CATCATTCCAGTTTTAGAAGCTCCACATCGAA GACGAGAGTGGCATGTGGTGGGATGATGCCT GGGTGCCCAGTGGCACCATAGGCATAATCTG GAGATATAGTCAGTTTGGCTCTCTGACCCACA CTCATCTGGGCAACCCCTTCTTCCCAGCCTCG GATCACCTCCTGCTTGCCTAGCATAAACTTAA AGGGCTTGTTTCTGTCCCGGGAGGAATCAAA TTTCTTTCCATCTTCAAGCATCCCGGTGTAGT GCACCACGCAGGTCTGGCCGCGCTTGGGGAA GGTGCGCCCGTCTCCTGGGGAGATGGTTTCC ACCTGCACTCCCGTGCTCAGTCTG(配列番号500)

【０９１３】

二量体化ドメインを組み入れるための標的タンパク質は特に限定されない;しかしながら、二重特異性リガンドの存在下におけるそれらの二量体化は(ひとたびPEによって改変されると)、何らかの有利な生物学的効果、例えばシグナル経路、減少した免疫応答性などを生ずるということが有利である。種々の側面では、二量体化ドメインのPE依存的組み入れによって二量体化させられるべきである標的タンパク質同士は、同じタンパク質または異なるタンパク質であり得る。好ましくは、タンパク質は、二量体化したときには、1以上の下流の生物学的カスケード、例えばシグナル伝達カスケード、リン酸化などを誘発する。PEが二量体化ドメインを組み入れるために用いられ得る例示の標的タンパク質は:

【表５５－１】

膜結合受容体	キナーゼドメイ	使用される	シグナルカスケー	参照

【表５５－２】

	ンが融合される	CID	ド	
T細胞受容体	FKBP12	FK1012(FK506二量体)	T細胞受容体シグナル	Science 262, 1019-24(1993) Chem. Biol. 1, 163-172(1994).
Fas受容体	ネズミシクロフィリンC	シクロスポリンA二量体	アポトーシスのためのFas経路	Chem. Biol. 3, 731-738(1996).
インスリン受容体	FKBP12	FK1012(FK506二量体)	インスリンシグナル	Curr. Biol. 8, 11-18(1998).
血小板由来増殖因子(PDGF)ベータ	FKBP12	FK1012(FK506二量体)	PDGF中胚葉形成シグナル	Curr. Biol. 8, 11-18(1998).
エリスロポエチン受容体(EpoR)	FKBP12	FK1012(FK506二量体)	EpoRによって媒介される増殖シグナル	Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 3076-3081(2002).

を包含するが、これらに限定されない。

【０９１４】

一側面において、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子システムは、生細胞または患者の目当ての標的タンパク質をコードする1以上の遺伝子上に、二量体化ドメインをコードする配列を組み入れるために用いられ得る。これは「多重フラッププライム編集-CIDシステム」と言われ得、CIDは二重特異性リガンドであり、これは、多重フラッププEによって組み入れされる二量体化ドメインに夫々が融合された標的タンパク質の二量体化を誘導した。この編集は単独では生理学的効果を有さないはずである。典型的には夫々が標的タンパク質のコピーに融合されている2つの二量体化ドメインに同時に結合し得る二量体低分子である二重特異性リガンドの投与によって、二重特異性リガンドは標的タンパク質の二量体化を引き起こす。次いで、この標的タンパク質二量体化イベントは、生物学的シグナルイベント、例えば赤血球形成またはインスリンシグナルを誘導する。多重フラッププライム編集による低分子結合タンパク質(すなわち、二量体化ドメイン)をコードする遺伝子のゲノム取り入れによって、二量体化によって誘導される生物学的プロセス、例えば受容体シグナルを便利な低分子薬物(すなわち、二重特異性リガンド)のコントロール下に置くための新たな方法が、本明細書に記載される。

【０９１５】

タンパク質二量体化はユビキタスな生物学的プロセスである。注意すべきことに、多くの膜結合受容体のホモ二量体化はシグナルカスケードを開始することが知られており、多くの場合に深大な生物学的帰結を有する。薬物としての使用を認可されたいくつもの天然低分子産物は、それらの作用機序の一部としてタンパク質二量体化の化学的誘導因子として作用する[92]。例えば、FK506はFKBP12にきつく結合し、もたらされる低分子-タンパク質複合体は次いでホスファターゼカルシニューリンに結合し、それによってT細胞受容体シグナルのあるステップを阻害する[93]。同様に、シクロスポリンAはシクロフィリンおよびカルシニューリンの二量体化を誘導し、ラパマイシンはFKBPおよびmTORの二量体化を誘導する[93,94]。

【０９１６】

1つの態様では、FK506:FKBP12およびシクロスポリンA:シクロフィリン低分子:タンパク質結合相互作用の選択的な高親和性の結合を活用して、二量体化の合成の化学的誘導因子もまた開発されている。ある例では、シグナル受容体の細胞質ドメインがFKBP12によってタグ付けされたときに、FK1012と呼称されるFK506の2つの単位からなる低分子がシグナル伝達を成し遂げることが示された[95]。以来、二量体化の化学的誘導因子(

CID)がいくつものシグナル経路をコントロールするために用いられている[96～103]。

【０９１７】

生物学的プロセスを研究するための有用なツールではあるが、治療学的適用について合成CIDに当面する1つの課題は、患者へのFKBP12またはシクロフィリン-標的タンパク質キメラの導入が難しいということである。

【０９１８】

本開示は複数の概念を一緒に持って来て、先にはアクセス不可能な治療学的プロセスを生出する。第1の概念は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集(例えば二重フラップまたは四重フラッププライム編集)であり、これは生細胞における標的化された挿入を包含する精密なゲノム編集を許す。第2の概念は化学物質によって誘導される二量体化であり、細胞培養物におけるシグナルおよびオリゴマー化プロセスの低分子コントロールを可能化した強力なツールである。

【０９１９】

タンパク質二量体化の化学的コントロールが有益な治療学的効果を有し得た特定のケースが同定されている。

【０９２０】

インスリン受容体は、細胞質キナーゼドメインのリン酸化によって細胞外ドメインへのインスリン結合に応答するヘテロ四量体膜貫通タンパク質である[104]。膜局在構成要素、インスリン受容体のC末端キナーゼドメイン、および3コピーのFKBP12から成る操作されたキメラタンパク質は、細胞培養物においてFK1012に応答し、インスリン応答を開始する99。類似に、患者細胞のネイティブなインスリン受容体のキナーゼドメインのC末端の端へのFKBP12の融合は、FK1012依存的なリン酸化とインスリンシグナルカスケードの開始とを許すはずであるということが予想される。このシステムは、インスリンを作り得ない(例えば1型糖尿病)または弱くインスリンに応答する(例えば2型糖尿病)患者において、インスリン使用を置き換えるかまたは補完し得る。

【０９２１】

加えて、エリスロポエチンは、エリスロポエチン受容体(EpoR)に結合することによって赤血球増殖を刺激し、二量体化または予め形成された受容体二量体の立体配座変化どちらかを誘導し、これはJak/STATシグナルカスケードの活性化をもたらす[105]。FKBP12によってタグ付けされたEpoRの膜にアンカー固定される細胞質ドメインのFK1012によって誘導されるオリゴマー化は、Jak/STATシグナルカスケードシグナルを開始および細胞増殖を促進するために十分であるということが実証されている[106]。患者細胞においてプライム編集によってFKBP12をネイティブなEpoRに融合することは、赤血球増殖(赤血球形成)のFK1012によって誘導されるコントロールを許すであろうということが予期される。このシステムは貧血患者において赤血球成長を誘発するために用いられ得る。FK1012誘導性のEpoRは、ex vivo操作を経過した血液細胞のin vivoの選択マーカーとしてもまた使用され得る。

【０９２２】

原理的には、いずれかの受容体チロシンキナーゼはプライム編集-CID治療学の見込みある標的である。下の表は、ヒトゲノム上の全ての受容体チロシンキナーゼのリストを包含する[110]。

【表５６】

ファミリー	受容体	同義	NT 受託	PROT 受託	染色体
ALK ファミリー	ALK	CD,	NM_004304	NP_004295	2p23
	LTK	TYK1	NM_002344	NP_002335	15q15.1-q21.1
AXL ファミリー	AXL	UFO, Tyro7(r) Ark(m)	NM_001699	NP_001690	19q13.1
	MER	MERTK, NYK, Eyk(cn)	NM_006343	NP_006334	2q14.1
	TYRO3	RSE, SKY, BRT, DTK, TIF	NM_006293	NP_006284	15q15.1-q21.1
DDR ファミリー	DDR1	CAK, TRKE, NEP, NTRK4, EDDR1, PTK3	NM_013993	NP_001945	6p21.3
	DDR2	TKT, TYRO10, NTRKR3	NM_006182	NP_006173	1q21-q22
EGFR ファミリー	EGFR	ERBB, ERBB1	NM_005228	NP_005219	7p12
	ERBB2	HER2, Neu(r), NGL	NM_004448	NP_004439	17q11.2-q12
	ERBB3	HER3	NM_001982	NP_001973	12q13
	ERBB4	HER4	NM_005235	NP_005226	2q33.3-q34
EPH ファミリー	EPHA1	EPH, EPHT	NM_005232	NP_005223	7q32-q36
	EPHA2	ECK, Sek2(m), Myk2(m)	NM_004431	NP_004422	1p36
	EPHA3	HEK, ETK1, Tyro4(r), Mdk4(m), Cek4(ch)	NM_005233	NP_005224	3p11.2
	EPHA4	HEK8, Tyro1(r), Sek1(m), Cek8(ch)	NM_004438	NP_004429	2q36-qter
	EPHA5	HEK7, Ehk1(r), Bsk(r), Cek7(ch)	L36644	P54756	
	EPHA6	DKFZp434C1418, Ehk2(r)	AL133886		
	EPHA7	HEK11, Mdk1(m), Ebk(m), Ehk3(r), Cek11(ch)	NM_004440	NP_004431	6q21
	EPHA8	HEK3, KIAA1469, Eek(r), Cek10(ch)	AB040892	CAB61612	1q23-q24
	EPHB1	NET, EPHT2, HEK6, Elk(r), Cek6(ch)	NM_004441	NP_004432	3q21-q23
	EPHB2	HEK5, ERK, DRT, EPHT3, Tyro5(r), Nuk(m), Sek3(m), Cek5(ch)	AFC25304	AAB94602	1p36.1-p35
	EPHB3	HEK2, Tyro6, Mdk5(m), Sek4(m)	NM_004443	NP_004434	3q21-qter
	EPHB4	HTK, Tyro11(r), Mdk2(m), Myk1(m)	NM_004444	NP_004435	
	EPHB6	HEP, Mep(m), Cek1(cn)	NM_004445	NP_004436	7q33-q35
FGFR ファミリー	FGFR1	FLT2, bFGFR, FLG, N-SAM	M34641	AAA35835	8p11.2
	FGFR2	KGFR, K-SAM, Bek(m), CFD1, JWS, Cek3(ch)	NM_000141	NP_000132	10q26
	FGFR3	HSFGFR, ACH, Cek2(ch)	NM_000142	NP_000133	4p16.3
	FGFR4		NM_002011	NP_002002	5q35.1-qter
IGFR ファミリー	IGF1R	JTK13	NM_000875	NP_000866	15q25-q26
	INSR	IR	NM_000208	NP_000199	19p13.3-p13.2
	INSRR	IRR	J05046	AAC31759	1q21-q23
MET ファミリー	MET	HGFR	NM_000245	NP_000236	7q31
	RON	MST1R, CDw136, Pv2(m), STK(m), SEA(ch)	NM_002447	NP_002438	3p21.3
MUSK ファミリー	MUSK	Nsk2(m), Mk1(m), Mk2(m)	NM_005592	NP_005583	9q31.3-q32
PDGFR ファミリー	CSF1R	FMS, C-FMS, CD115	NM_005211	NP_005202	5q31-q32
	FLT3	FLK2, STK1, CD135	NM_004119	NP_004110	13q12
	KIT	Stk(m), CKIT	NM_000222	NP_000213	4q11-q12
	PDGFRA		NM_006206	NP_006197	4q11-q13
	PDGFRB	PDGFR, JTK12	NM_002609	NP_002600	5q31-q32
PTK7 ファミリー	PTK7	CCK4, KLG(ch)	NM_002821	NP_002812	6p21.1-p12.2
RET ファミリー	RET	MENSAB, HSCR1, MTC1	X12949	P07949	10q11.2
ROR ファミリー	ROR1	NTRKR1	NM_005012	NP_005003	1p32-p31
	ROR2	NTRKR2	NM_004560	NP_004551	
ROS ファミリー	ROS1	MCF3	NM_002944	NP_002935	6q22
RYK ファミリー	RYK	Vik(m), Mrk(m)	S69184	AAB26441	3q22
TIE ファミリー	TEK	TIE2	NM_000459	NP_000450	9p21
	TIE	TIE1, JTK14	NM_005424	NP_005415	1p34-p33
TRK ファミリー	NTRK1	TRK, TRKA	NM_002529	NP_002520	1q21-q22
	NTRK2	TRKB	NM_006180	NP_006171	9q22.1
	NTRK3	TRKC	NM_002530	NP_002521	15q25
VEGFR ファミリー	VEGFR1	FLT1	NM_002019	NP_002010	13q12
	VEGFR2	KDR, FLK1		AAB88005	4q11-q12
	VEGFR3	FLT4, PCL	NM_002020	NP_002011	5q34-q35
AATYK ファミリー	AATYK	AATK, KIAA0641	NM_004920	NP_004911	17q25.3
	AATYK2	KIAA1079	NM_014916	NP_055731	7p21-q22
	AATYK3				15q13.2-q13.3

【０９２３】

多重フラッププライム編集-CIDシステムには数々の利点がある。1つのかかる利点は、それが、典型的には製造、コスト、送達、生産、または貯蔵において複雑化を呈するタンパク質である内生リガンドを薬物様低分子によって置き換え得るということである。これらはIVまたは注射によって投与される代わりに経口投与され得、FDA認可された薬物から難なく調製され(またはそれら自体がすでに薬物である)、タンパク質薬物に典型的に関連する特殊な生産または貯蔵コストを招かない。別の利点は、編集が単独では生理学的効果を有さないはずであるということである。標的タンパク質二量体化の量は低分子CIDを投薬することによってコントロールされ得る。さらに、標的タンパク質二量体化は、C

IDのモノマー形態を追加することによって難なくかつ急速に可逆的である。さらに別の利点は、単一のリガンドが複数の受容体を標的化する場合に、1つの受容体のみをプライム編集することによって選択性が達成され得るということである。最後に、プライム編集に用いられる送達方法に依存して、局在した組織または臓器に編集を制限することもまた可能であり得、特定のエリアのみにおいて誘導可能な受容体活性化を許す。

【０９２４】

多重フラッププライム編集による編集効率が十分高く、2つの別個の編集イベントが高いレベルで生起し得る場合には、目当ての2つのタンパク質を異なる低分子結合ドメイン(例えばFKBPおよびシクロフィリン)によってタグ付けし、低分子ヘテロ二量体(例えばFK506-シクロスポリンA二量体)によるヘテロ二量体化を誘導することもまた可能であろう。

【０９２５】

ネイティブなタンパク質へのFKBP12または他の低分子結合タンパク質の融合体は、一般的には、組織培養によるプラスミドからの過剰発現によって達成されている。続く化学物質によって誘導される二量体化は、融合タンパク質を生ずる細胞に表現型変化を誘導することが実証されている。

【０９２６】

以下の参考文献が上のセクションにおいて引用され、参照により本明細書に組み込まれる。

【表５７－１】

1. Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Three-part inventions: intracellular signaling and induced proximity. *Trends Biochem. Sci.* 21, 418–22 (1996).

2. Liu, J. *et al.* Calcineurin Is a Common Target of A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* 66, 807–815 (1991).

3. Keith, C. T. *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* 369, 756–758 (2003).

4. Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. S. & Crabtree, G. R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* 262, 1019–24 (1993).

5. Pruschy, M. N. *et al.* Mechanistic studies of a signaling pathway activated by the organic dimerizer FK1012. *Chem. Biol.* 1, 163–172 (1994).

6. Spencer, D. M. *et al.* Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Curr. Biol.* 6, 839–847 (1996).

7. Belshaw, P. J., Spencer, D. M., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Controlling programmed cell death with a cyclophilin-cyclosporin-based chemical inducer of dimerization. *Chem. Biol.* 3, 731–738 (1996).

【表５７－２】

8. Yang, J. X., Symes, K., Mercola, M. & Schreiber, S. L. Small-molecule control of insulin and PDGF receptor signaling and the role of membrane attachment. *Curr. Biol.* 8, 11–18 (1998).

9. Belshaw, P. J., Ho, S. N., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 93, 4604–4607 (2002).

10. Stockwell, B. R. & Schreiber, S. L. Probing the role of homomeric and heteromeric receptor interactions in TGF-β signaling using small molecule dimerizers. *Curr. Biol.* 8, 761–773 (2004).

11. Spencer, D. M., Graef, I., Austin, D. J., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. A general strategy for producing conditional alleles of Src-like tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9805–9809 (2006).

12. Holsinger, L. J., Spencer, D. M., Austin, D. J., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. Signal transduction in T lymphocytes using a conditional allele of Sos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9810–9814 (2006).

13. Myers, M. G. Insulin Signal Transduction and the IRS Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 615–658 (1996).

14. Watowich, S. S. The erythropoietin receptor: Molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J. Investig. Med.* 59, 1067–1072 (2011).

15. Blau, C. A., Peterson, K. R., Drachman, J. G. & Spencer, D. M. A proliferation switch for genetically modified cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3076–3081 (2002).

16. Clackson, T. *et al.* Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10437–10442 (1998).

17. Diver, S. T. & Schreiber, S. L. Single-step synthesis of cell-permeable protein dimerizers that activate signal transduction and gene expression. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5106–5109 (1997).

18. Guo, Z. F., Zhang, R. & Liang, F. Sen. Facile functionalization of FK506 for biological studies by the thiol-ene 'click' reaction. *RSC Adv.* 4, 11400–11403 (2014).

19. Robinson, D. R., Wu, Y.-M. & Lin, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548–5557 (2000).

【０９２７】

Ｇ．リコンビナーゼ標的部位を挿入するためのプライム編集の使用

別の側面において、多重フラッププライム編集(例えば図９０、９５、９７Ａ、９８Ａによって表されるとおり)は、リコンビナーゼ部位(または「リコンビナーゼ認識配列」)を所望のゲノム部位に挿入するために用いられ得る。リコンビナーゼ部位の挿入は、部位特異的な遺伝子変化をゲノムに成し遂げるためのプログラムされた位置付けを提供する。かかる遺伝子変化は、他の遺伝子変化の中でも、例えばプラスミドのゲノム取り入れ、ゲノム欠失または挿入、染色体転座、およびカセット交換を包含し得る。遺伝子変化のこれらの例示の型は図６４(ｂ)～(ｆ)において例解されている。次いで、組み入れされたリコンビナーゼ認識配列は、その部位における部位特異的な組み換えを行うために用いられて、種々の組み換えアウトカム、例えば切除、取り入れ、逆位、またはＤＮＡフラグメントの交換を成就し得る。例えば、図６５はリコンビナーゼ部位の組み入れを例解し、これは次いでＧＦＰ発現マーカーを含むＤＮＡドナー鋳型を取り入れするために用いられ得る。リコンビナーゼ部位に取り入れされたＧＦＰ発現システムを含有する細胞は、蛍光発光するであろう。

【０９２８】

リコンビナーゼ部位をゲノムに組み入れる機序は、ペプチド/タンパク質およびRNAタグなどの他の配列をゲノムに組み入れることに類縁である。リコンビナーゼ標的配列の組み入れを例示する模式図が図64(a)に示されている。プロセスは、リコンビナーゼ標的配列が導入されるであろう所望の標的遺伝子座を選択することによって始まる。次に、プライム編集因子融合体が提供される(「RT-Cas9:gRNA」)。ここで、「gRNA」はPEgRNAを言い、これは本明細書に記載の原理を用いてデザインされ得る。PEgRNAは種々の態様において図3Dに対応するアーキテクチャを含むであろう(5'-[～20ntスペーサー]-[gRNAコア]-[伸長アーム]-3'であって、伸長アームは3'→5'の方向にプライマー結合部位(「A」)、編集鋳型(「B」)、および相同アーム(「C」)を含む。編集鋳型(「B」)は、リコンビナーゼ部位に対応する配列、すなわち、リコンビナーゼ部位のセンスまたはアンチセンス鎖どちらかでありかつ多重フラッププライム編集プロセスによってゲノムDNA標的遺伝子座に組み込まれる相補的な一本鎖DNAをコードするPEgRNAの一本鎖RNAを含むであろう。

【０９２９】

種々の側面では、本開示は、ヒトまたは他のゲノム上の高価値の遺伝子座にリコンビナーゼ認識配列を導入するための多重フラップPEの使用を可能にする。これらは、部位特異的なリコンビナーゼ(単数または複数)に対する暴露後に、精密なかつ効率的なゲノム改変を導くであろう(図64)。図64に示されている(show)種々の態様では、PEは、(b)DNAドナー鋳型のゲノム取り入れの部位としての使用のための単一のSSR標的を挿入するために用いられ得る。(c)は、どのようにしてSSR標的部位のタンデム挿入がゲノムのある部分を欠失させるために用いられ得るかを示す。(d)は、どのようにしてSSR標的部位のタンデム挿入がゲノムのある部分を逆位させるために用いられ得るかを示す。(e)は、どのようにして2つの遠位の染色体領域における2つのSSR標的部位の挿入が染色体転座をもたらし得るかを示す。(f)は、どのようにしてゲノム上の2つの異なるSSR標的部位の挿入がDNAドナー鋳型からのカセットを交換するために用いられ得るかを示す。ゲノム改変の型の夫々は、SSR標的を挿入するためにPEを用いることによって想定されるが、このリストもまた限定することを意味されない。

【０９３０】

リコンビナーゼ認識配列の多重フラップPEによって媒介される導入は、大スケールのゲノム欠陥、例えば遺伝子喪失、逆位、もしくは重複、または染色体転座によって引き起こされる遺伝子疾患の処置にとって特に有用であり得る[1～7](表6)。例えば、ウィリアムズ・ボイレン症候群は染色体7上の24の欠失によって引き起こされる発達障害である21。現行では、生細胞における複数の遺伝子全体の効率的なかつ標的化された挿入のためのテクノロジーは存在しない(かかる全長遺伝子挿入をするPEのポテンシャルは現行では調査されているが、まだ確立されていない);しかしながら、PEによって挿入される標的におけるリコンビナーゼによって媒介される取り入れは、このおよび他の疾患の永久的な治癒への1つのアプローチをオファーする。加えて、リコンビナーゼ認識配列の標的化された導入は、トランスジェニック植物、動物研究モデル、バイオプロダクション細胞株、または他のカスタム真核細胞株の生成を包含する適用にとって高度に有能であり得る。例えば、多重フラップPE特異的な標的におけるトランスジェニック植物のリコンビナーゼによって媒介されるゲノム再構成は、改善された特性を有する農作物を生成することのボトルネックの1つを克服し得る[8,9]。

【０９３１】

表6.リコンビナーゼ認識配列の多重フラップPEに基づく組み入れによって修復され得る大スケールゲノム改変にリンクした遺伝子疾患の例。

【表５８】

疾患	原因
トリソミー17p	遺伝子重複
シャルコー・マリー・トゥース病I型	遺伝子重複
スミス・マギニス症候群	遺伝子欠失
ウィリアムズ・ボイレン症候群	遺伝子欠失
ド・ラ・シャペル症候群	染色体転座
ダウン症候群(いくつかの形態)	染色体転座
血友病A	遺伝子逆位
ハンター症候群	遺伝子逆位

【０９３２】

いくつものSSRファミリーメンバーが特徴付けられ、それらのリコンビナーゼ認識配列が記載されており、天然のおよび操作されたチロシンリコンビナーゼ(表7)、ラージセリンインテグラーゼ(表8)、セリンリゾルバーゼ(表9)、およびチロシンインテグラーゼ(表10)を包含する。増強されたゲノム取り入れ率を実証する改変された標的配列もまたいくつかのSSRについて記載されている[22-30]。天然のリコンビナーゼに加えて、別物の特異性を有するプログラム可能なリコンビナーゼが開発されている[31～40]。所望の適用に依存して、PEを用いて、これらの認識配列の1以上が、規定された位置付け、例えばセーフハーバー遺伝子座においてゲノム上に導入され得る[41～43]。

【０９３３】

例えば、プライム編集によるゲノム上の単一のリコンビナーゼ認識配列の導入は、DNAドナー鋳型との取り入れ的な組み換えをもたらすであろう(図64b)。ヒト細胞においてロバストに作動するセリンインテグラーゼは、遺伝子取り入れに特に良く適し得る[44,45]。

【０９３４】

加えて、標的の同一性および向きに依存して、2つのリコンビナーゼ認識配列の導入は介在配列の欠失、介在配列の逆位、染色体転座、またはカセット交換をもたらし得る(図64c～f)。すでにリコンビナーゼ標的に密に似ている内生配列を選ぶことによって、完全なリコンビナーゼ標的を導入するために要求される編集の範囲は縮減されるであろう。

【０９３５】

最後に、いくつかのリコンビナーゼは、ネイティブに生起する偽部位においてヒトまたは真核ゲノムに取り入れすることが実証されている[46～64]。多重フラッププライム編集は、これらの天然の偽部位における取り入れ率を増強するために、または代替的には欲されないオフターゲット配列としての用をなし得る偽部位を消去するために、これらの遺伝子座を改変するために用いられ得る。

【０９３６】

本開示は、多重フラップPEを用いて真核ゲノム上にリコンビナーゼ標的配列を導入するための一般的な方法論を記載する。これの適用は無限に近い。ゲノム編集反応はCRISPR/Cas9タンパク質と逆転写酵素ドメインとのキメラ融合体の「プライム編集因子」による使用を意図され、これはカスタムのプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)を利用する。さらに伸長して、Cas9ツールおよび相同組み換え修復(HDR)経路は、いくつかの技術を用いてインデル率を低下させることによって、DNA鋳型からリコンビナーゼ認識配列を導入するためにもまた有効利用され得る[65～67]。ヒト細胞培養における概念実証実験が図65に示されている。いくつかの態様において、プライム編集因子は多重フラッププライム編集因子である。

【０９３７】

次のいくつかの表は、リコンビナーゼ認識配列のPEによって導かれる組み入れに関し

て上の記載に引用され、用いられ得る例示のリコンビナーゼと多重フラップPEによって組み入れられ得るそれらの対応するリコンビナーゼ認識配列とのリストを提供する。

表7.チロシンリコンビナーゼおよびSSR標的配列。

【表５９－１】

リコンビナーゼ	リコンビナーゼ認識配列	名称
Cre	ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT(配列番号 517)	*loxP*
Dre	TAACTTTAAATAATGCCAATTATTTAAAGTTA(配列番号 518)	*rox*
VCre	TCAATTTCTGAGAACTGTCATTCTCGGAAATTGA(配列番号 519)	*loxV*
SCre	CTCGTGTCCGATAACTGTAATTATCGGACATGAT(配列番号 520)	*loxS*
Flp	GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC(配列番号 521)	*FRT*
B2	GAGTTTCATTAAGGAATAACTAATTCCCTAATGAAACTC(配列番号 522)	*loxB*
B3	GGTTGCTTAAGAATAAGTAATTCTTAAGCAACC(配列番号 523)	*loxB3*
Kw	ACGAAAAATGGTAAGGAATAGACCATTCCTTACCATTTTTGG	

【表５９－２】

リコンビナーゼ	リコンビナーゼ認識配列	名称
	T(配列番号 524)	
R	TTGATGAAAGAATAACGTATTCTTTCATCAA(配列番号 525)	*RS*
TD1-40	GTGCGTCAAATAATAACGTATTATTTGACACTT(配列番号 526)	*TDRS*
Vika	AATAGGTCTGAGAACGCCCATTCTCAGACGTATT(配列番号 527)	*vox*
Nigri	TGAATGTCCTATAATTACACTTATAGGACATTCA(配列番号 528)	*nox*
Panto	GAAACTTTAAATAATAAGTCTTATTTAAAGTTTC(配列番号 529)	*pox*
Kd	AAACGATATCAGACATTTGTCTGATAATGCTTCATTATCAGACAAATGTCTGATATCGTTT(配列番号 530)	*loxK*
Fre	ATATATACGTATATAGACATATATACGTATATAT(配列番号 531)	*loxH*
CreALSHG	ATAACTCTATATAATGTATGCTATATAGAGTTAT(配列番号 532)	*loxM7*
Tre	ACAACATCCTATTACACCCTATATGCCAACATGG(配列番号 533)	*loxLTR*
Brec1	AACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTT(配列番号 534)	*loxBTR*
Cre-R3M3	GATACAACGTATATACCTTTCTATACGTTGTTTA(配列番号 535)	*loxK2*

表8.ラージセリンインテグラーゼおよびSSR標的配列。

【表６０－１】

リコンビナーゼ	リコンビナーゼ認識配列 左	リコンビナーゼ認識配列 右
Bxb1	GGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACC(配 列番号 536)	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT(配列番号 537)
phiC31	GTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGGG(配列番号 538)	TGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTACTCC(配列番号 539)
R4	TGTTCCCCAAAGCGATACCACTTGAAGCAGTGGTACTGCTTGTGGGTACA(配列番号 540)	GCATGTTCCCCAAAGCGATACCACTTGAAGCAGTGGTACTGCTTGTGGGTACACTCTGCGGGTG(配列番号 541)
phiBT1	GGTGCTGGGTTGTTGTCTCTGGACAGTGATCCATGGGAAACTACTCAGCACC(配列番号 542)	CAGGTTTTTGACGAAAGTGATCCAGATGATCCAG(配列番号 543)
MJ1(phiFC1)	ATTTTAGGTATATGATTTTGTTTATTAGTGTAAATAACACTATGTACCTAAAAT(配列番号 544)	CAAAGGATCACTGAATCAAAAGTATTGCTCATCCACGCGAAA(配列番号 545)

【表６０－２】

リコンビナーゼ	リコンビナーゼ認識配列 左	リコンビナーゼ認識配列 右
MR11	TTTGTGCGGAACTACGAACAGTTCATTAATACGAAGTGTACAAACTTCCATACAA(配列番号 546)	CGAAAATGTATGGAGGCACTTGTATCAATATAGGATGTATACCTTCGAAGACACTT(配列番号 547)
TP901-1	GAGTTTTTATTTCGTTTATTTCAATTAAGGTAACTAAAAAACTCCTTTTAAGG(配列番号 548)	ATGCCAACACAATTAACATCTCAATCAAGGTAAATGCTTTTTGCTTTTTTTGC(配列番号 549)
A118	TTCCTCGTTTTCTCTCGTTGGAAGAAGAAGAAACGAGAAA(配列番号 550)	TTTCGGATCAAGCTATGAAGGACGCAAAGAGGGAACTAAA(配列番号 551)
U153	TTCCTCGTTTTCTCTCGTTGGACGGAAACGAATCGAGAAA(配列番号 552)	TTTCGGATCAAGCTATGAAGGACGCAAAGAGGGAACTAAA(配列番号 553)
phiRV1	GTAGTGTATCTCACAGGTCCACGGTTGGCCGTGGACTGCTGAAGAACATTCC(配列番号 554)	GAAGGTGTTGGTGCGGGGTTGGCCGTGGTCGAGGTGGGGT(配列番号 555)
phi370.1	AAAAAAATACAGCGTTTTTCATGTACAACTATACTAGTTGTAGTGCCTAAAA(配列番号 556)	TTGTAAAGGAGACTGATAATGGCATGTACAACTATACTCGTCGGTAAAAAGGCA(配列番号 557)
TG1	TCCAGCCCAACAGTGTTAGTCTTTGCTCTTACCCAGTTGGGCGGGA(配列番号 558)	GATCAGCTCCGCGGGCAAGACCTTTCTCCTTCACGGGGTGGAAGGTC(配列番号 559)
WB	CTAGTTTTAAAGTTGGTTATTAGTTACTGTGATATTTATCACGGTACCCAATAACCAATGAAT(配列番号 560)	CGGAAGGTAGCGTCAACGATAGGTGTAACTGTCGTGTTTGTAACGGTACTTCCAACAGCTGGCGCCGCCAC(配列番号 561)
BL3	CAATGAAAAACTAGGCATGTAGAAGTTGTTTGT(配列番号 562)	TTTCCACAGACAACTCACGTGGAGGTAGTCAC(配列番号 563)
SprA	TGTAGTAAGTATCTTAATATACAGCTTTATCTGTTTTTTAAGATACTTACTACTTT(配列番号 564)	CACCCATTGTGTTCACAGGAGATACAGCTTTATCTGTACTGATATTAATGACATGCTG(配列番号 565)
phiJoe	AGTTGTGGCCATGTGTCCATCTGGGGGCAGATGGAGACGGGGTCACA(配列番号 566)	ATCTGGATGTGGGTGTCCATCTGCGGGCAGACGCCGCAGTCGAAGCACGG(配列番号 567)
--	--	ACCTTGATCTCGGTGTCCATCGCCGGGCAGACGCCGCAGTCGAAGCACGG(配列番号 568)
phiK38	CCCTAATACGCAAGTCGATAACTCTCCTGGGAGCGTTGACAACTTGCGCACCCTGATCTG(配列番号 569)	GAGCGCCGGATCAGGGAGTGGACGGCCTGGGAGCGCTACACGCTGTGGCTGCGGTCGGTGC(配列番号 570)
Int2	GCTCATGTATGTGTCTACGCGAGATTCTCGCCCGAGAACTTCTGCAAGGCACTGCTCTTGGCT(配列番号 571)	GGACGGCGCAGAAGGGGAGTAGCTCTTCGCCGGACCGTCGACATACTGCTCAGCTCGTC(配列番号 572)
Int3	ATGGATAAAAAAATACAGCGTTTTTCATGTACAACTATACTAGTTGTAGTGCCTAAATAATGCTT(配列番号 573)	GTTTGTAAAGGAGACTGATAATGGCATGTACAACTATACTCGTCGGTAAAAAGGCATCTTAT(配列番号 574)
Int4	AAAAATTACAAAGTTTTCAACCCTTGATTTGAATTAGCGGTCAAATAATTTGT	TTCCAAAGAGCGCCCAACGCGACCTGAAATTTGAATAAGACTGCTGCTTGTGTAAAG

【表６０－３】

リコンビナーゼ	リコンビナーゼ認識配列 左	リコンビナーゼ認識配列 右
	AATTCGTTT(配列番号 575)	GCGATGATT(配列番号 576)
Int7	GTGTTATAAACCTGTGTGAGAGTTAAGTTTACATGCCTAACCTTAACTTTTACGCAGGTTCAGCTT(配列番号 577)	AGACGAGAAACGTTCCGTCCGTCTGGGTCAGTTGGGCAAAGTTGATGACCGGGTCGTCCGTT(配列番号 578)
Int8	TTAATAAACTATGGAAGTATGTACAGTCTTGCAATGTTGAGTGAACAAACTTCCATAATAAAAT(配列番号 579)	CAATCATCAGATAACTATGGCGGCACGTGCATTAACCACGGTTGTATCCCGTCTAAAGTACTCGT(配列番号 580)
Int9	GTGGTTGTTTTTGTTGGAAGTGTGTATCAGGTATCTGCATAGTTATTCCGAACTTCCAATTA(配列番号 581)	TTTATATTGCGAAAAATAATTGGCGAACGAGGTAACTGGATACCTCATCCGCCAATTAAAATTTG(配列番号 582)
Int10	GGAAAATATAAATAATTTTAGTAACCTACATCTCAATCAAGGATAGTAAAACTCTCACTCTT(配列番号 583)	AGCACGCTGATAATCAGCAAGACCACCAACATTTCCACCAATGTAAAAGCTTTAACCTTAGC(配列番号 584)
Int11	GTTTATATGTTTACTAATAAGACGCTCTCAACCCATAAAGTCTTATTAGTAAACATATTTCAACT(配列番号 585)	ATGGATTTTGCAGATTCCCAGATGCCCCTACAGAAAGAGGTACAAAACATTTATTGGAATTAATT(配列番号 586)
Int12	TTTTTGTATGTTAGTTGTGTCACTGGGTAGACCTAAATAGTGACACAACTGCTATTAAAATTTAA(配列番号 587)	GTTCGTGGTAACTATGGGTGGTACAGGTGCCACATTAGTTGTACCATTTATGTTTATGTGGTTAAC(配列番号 588)
Int13	CAATAACGGTTGTATTTGTAGAACTTGACCAGTTGTTTTAGTAACATAAATACAACTCCGAATA(配列番号 589)	GCATACATTGTTGTTGTTTTTCCAGATCCAGTTGGTCCTGTAAATATAAGCAATCCATGTGAGT(配列番号 590)
LI	GTTTAGTATCTCGTTATCTCTCGTTGGAGGGAGAAGAAACGGGATACCAAAA(配列番号 591)	TAACTTTTTCGGATCGAGTTATGATGGACGTAAAGAGGGAACAAAGCATCTA(配列番号 592)
Peaches	TAGTTTCCAATGTTACAGGAACTGCTGGCAGAATCCAACACATTGGAAGTCG(配列番号 593)	CGGTCTCCATCGGGATCTGCTGATCGAGCAGCATGCCGACCA(配列番号 594)
Bxz2	TAACCGCAAGTGTACATCCCTCGGCTGGCCGAGACAAGTACAGTTGCGACAG(配列番号 595)	CGGTCTCCATCGGGATCTGCTGATCGAGCAGCATGCCGACCA(配列番号 596)
SV1	ATGTGGTCCTTTAGATCCACTGACGTGGGTCAGTGTCTCTAAAGGACTCGCG(配列番号 597)	CATCAGGGCGGTCAGGCCGTAGATGTGGAAGAAACGGCAGCACGGCGAGGACG(配列番号 598)

表9.セリンリゾルバーゼおよびSSR標的配列。

【表６１－１】

リゾルバーゼ	リコンビナーゼ認識配列 左	リコンビナーゼ認識配列 右
Gin	CGTTTCCTGTAAACCGAGGTTTTGGATAAACA(配列番号 599)	CGTTTCCTGTAAACCGAGGTTTTGGATAATGG(配列番号 600)

【表６１－２】

Cin	GAGTTCTCTTAAACCAAGGTTTAGGATTGAAA(配列番号 601)	GAGTTCTCTTAAACCAAGGTATTGGATAACAG(配列番号 602)
Hin	TGGTTCTTGAAAACCAAGGTTTTTGATAAAGC(配列番号 603)	AAATTTTCCTTTTTGGAAGGTTTTTGATAACCA(配列番号 604)
Min	GCCTTCCCCTAAACCAACGTTTTTATGCCGCC(配列番号 605)	GCCTTCCCCCAAACCAAGGTAATCAAGAACGC(配列番号 606)
Sin	TTGTGAAATTTGGGTACACCCTAATCATACAA(配列番号 607)	CGTATGATTAGGGTGTATATTAATTT(配列番号 608)

表10.チロシンインテグラーゼおよび標的配列。

【表６２－１】

インテグラーゼ	*attP*	*attB*
HK022	CAAATGATTTTATTTTGACTAATAATGACCTACTTACATTAATTTACTGATAATTAAAGAGATTTTAAATATACAACTTATTCACCTAAAGGATGACAAAA(配列番号 609)	GCACTTTAGGTGAAAAAGGTT(配列番号 610)
	TAACATTAATCACTTAAAAATCATCGCATTACACTAATCTGTGGTTAAATGATAGACTACATAATGCGACAAAACGCAACATATCCAGTCACTATGAATCAACTACTTAGATAGTATTAGTGACCT(配列番号 611)	
P22	CTAAGTGGTTTGGGACAAAAATGGGACATACAAATCTTTGCATCGGTTTGCAAGGCTTTGCATGTCTTTCGAAGATGGGACGTGTGAGCGCAGGTATGACGTGGTATGTGTTGACTTAAAAGGTAGTTCTTATAATTCGTAATGCGAAGGTCGTAGGTTCGACTCCTATTATCGGCACCAGTTAAATCAAATACTTACGTATTATTCGTGCCTTCCTTATTTTTACTGTGGGACATATTTGGGACAGAAGTACCAAAAA(配列番号 612)	GCAGCGCATTCGTAATGCGAAGGTCGT(配列番号 613)
L5	GCGATCCCCATCCGCGACGTGCCAACTAGGTCTCCTCTCGTCGTGAACAAGGCTACCGGGTTGCAACTCCTGTGCAACTCTCAGGCTTCAACGCGCTTCTACGACCTGCAATTTCTTTCCACTTAGAGGATGCAGCCGAGAGGGGTAAAAACCTATCTTGACCGGCCCATATGTGGTCGGCAGACACCCATTCTTCCAAACTAGCTACGCGGGTTCGATTCCCGTCGCCCGCTCCGCTGGTCAGAGGGTGTTTTCGCCCTCTGGCCATTTTTCTTTCCAGGGGTCTGCAACTCTTGTGCGACTCTTCTGACCTGGGCATACGCGGTTGCAACGCATCCCTGATCTGGCTACTTTCGATGCTGACAAACGAATAGAGCCCCCCGCCTGCGCGAACAGACGAGGGGCATTCACA(配列番号 614)	GAGCGGGCGACGGGAATCGAACCCGCGTAGCTAGTTTGGAAGA(配列番号 615)

【０９３８】

種々の他の側面では、本開示は、1以上のリコンビナーゼ認識配列を組み入れるために

多重フラップPEを用いる方法と、部位特異的な組み換えへのそれらの使用とに関する。

【０９３９】

いくつかの態様では、部位特異的な組み換えは、種々の組み換えアウトカム、例えば切除、取り入れ、逆位、またはDNAフラグメントの交換を成就させ得る。

【０９４０】

いくつかの態様では、方法は、2以上の核酸(例えばDNA)分子の2以上の領域のまたはそれらの間の組み換えを誘導することにとって有用である。他の態様において、方法は、単一の核酸分子(例えばDNA)の2以上の領域のまたはそれらの間の組み換えを誘導することにとって有用である。

【０９４１】

いくつかの態様では、本開示は、部位特異的な組み換えによってドナーDNA鋳型を取り入れするための方法を提供し:(a)多重フラッププライム編集によってゲノム遺伝子座にリコンビナーゼ認識配列を組み入れること;(b)リコンビナーゼの存在下において、リコンビナーゼ認識配列をもまた含むDNAドナー鋳型とゲノム遺伝子座を接触させることを含む。

【０９４２】

他の態様において、本開示は、部位特異的な組み換えによってゲノム領域を欠失させるための方法を提供し:(a)多重フラッププライム編集によってゲノム遺伝子座にリコンビナーゼ認識配列のペアを組み入れること;(b)ゲノム遺伝子座をリコンビナーゼと接触させることを含み、それによって、リコンビナーゼ認識配列のペア間のゲノム領域の欠失を触媒する。

【０９４３】

さらに他の態様において、本開示は、部位特異的な組み換えによってゲノム領域を逆位させるための方法を提供し:(a)多重フラッププライム編集によってゲノム遺伝子座にリコンビナーゼ認識配列のペアを組み入れること;(b)ゲノム遺伝子座をリコンビナーゼと接触させることを含み、それによって、リコンビナーゼ認識配列のペア間のゲノム領域の逆位を触媒する。

【０９４４】

なお他の態様において、本開示は、第1のゲノム部位と第2のゲノム部位との間の染色体転座を誘導するための方法を提供し:(a)プライム編集によって第1のゲノム遺伝子座に第1のリコンビナーゼ認識配列を組み入れること;(b)多重フラッププライム編集によって第2のゲノム遺伝子座に第2のリコンビナーゼ認識配列を組み入れること;(c)第1および第2のゲノム遺伝子座をリコンビナーゼと接触させることを含み、それによって、第1および第2のゲノム遺伝子座の染色体転座を触媒する。

【０９４５】

他の態様において、本開示は、ゲノム遺伝子座とカセットを含むドナーDNAとの間のカセット交換を誘導するための方法を提供し:(a)多重フラッププライム編集によって第1のゲノム遺伝子座に第1のリコンビナーゼ認識配列を組み入れること;(b)多重フラッププライム編集によって第2のゲノム遺伝子座に第2のリコンビナーゼ認識配列を組み入れること;(c)第1および第2のリコンビナーゼ認識配列によってフランキングされているカセットを含むドナーDNAおよびリコンビナーゼと第1および第2のゲノム遺伝子座を接触させることを含み、それによって、フランキングされたゲノム遺伝子座とDNAドナー上のカセットとの交換を触媒する。

【０９４６】

ゲノム上の1より多くのリコンビナーゼ認識配列の挿入が関わる種々の態様では、リコンビナーゼ認識配列は同じかまたは異なり得る。いくつかの態様では、リコンビナーゼ認識配列は同じである。他の態様において、リコンビナーゼ認識配列は異なる。

【０９４７】

種々の態様において、リコンビナーゼはチロシンリコンビナーゼ、例えばCre、Dre、Vcre、Scre、Flp、B2、B3、Kw、R、TD1-40、Vika、Nigri、Panto、Kd、Fre、

Cre(ALSHG)、Tre、Brec1、またはCre-R3M3であり得、表7に示されているとおりである。かかる態様では、リコンビナーゼ認識配列は使用中のリコンビナーゼに対応する表7のRRSであり得る。

【０９４８】

種々の他の態様において、リコンビナーゼはラージセリンリコンビナーゼ、例えばBxb1、PhiC31、R4、phiBT1、MJ1、MR11、TP901-1、A118、V153、phiRV1、phi370.1、TG1、WB、BL3、SprA、phiJoe、phiK38、Int2、Int3、Int4、Int7、Int8、Int9、Int10、Int11、Int12、Int13、L1、peaches、Bxz2、またはSV1であり得、表8に示されているとおりである。かかる態様では、リコンビナーゼ認識配列は使用中のリコンビナーゼに対応する表8のRRSであり得る。

【０９４９】

なお他の態様において、リコンビナーゼはセリンリコンビナーゼ、例えばBxb1、PhiC31、R4、phiBT1、MJ1、MR11、TP901-1、A118、V153、phiRV1、phi370.1、TG1、WB、BL3、SprA、phiJoe、phiK38、Int2、Int3、Int4、Int7、Int8、Int9、Int10、Int11、Int12、Int13、L1、peaches、Bxz2、またはSV1であり得、表8に示されているとおりである。かかる態様では、リコンビナーゼ認識配列は使用中のリコンビナーゼに対応する表8のRRSであり得る。

【０９５０】

他の態様において、リコンビナーゼは表9に示されているとおりGin、Cin、Hin、Min、またはSinなどのセリンリゾルバーゼであり得る。かかる態様では、リコンビナーゼ認識配列は、使用中のリコンビナーゼに対応する表9のRRSであり得る。

【０９５１】

種々の他の態様において、リコンビナーゼは表10に示されているとおりHK022、P22、またはL5などのチロシンインテグラーゼであり得る。かかる態様では、リコンビナーゼ認識配列は、使用中のリコンビナーゼに対応する表10のRRSであり得る。

【０９５２】

いくつかの態様では、多重フラップPEによる部位特異的な組み換えのための方法のいずれかがin vivoでまたはin vitroで行われ得る。いくつかの態様では、部位特異的な組み換えための方法のいずれかが細胞に行われる(例えば、細胞のゲノムDNAを組み換える)。細胞は原核または真核であり得る。真核細胞などの細胞は本明細書に記載の対象などの個体(例えば、ヒト対象)中にあり得る。本明細書に記載の方法は、in vitroおよびin vivoの細胞の遺伝子改変にとって、例えば、トランスジェニック細胞、細胞株、もしくは動物の生成という文脈において、または対象の細胞のゲノム配列の変改、例えば遺伝子欠陥の修正において、有用である。

【０９５３】

[8]本願に記載される多重フラッププライム編集因子の態様

次の限定しない態様は、本願に記載される二重プライム編集因子およびそれらの使用の側面を記載する。

1．編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステムであって、システムが第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体を含み、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれが、(1)(i)核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)および(ii)RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドを含むプライム編集因子と;(2)スペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含むpegRNAとを含み、第1のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型が第1の一本鎖DNA配列をコードし、第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのDNA合成鋳型が第2の一本鎖DNA配列をコードし、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列はそれぞれが互いに対する相補性の領域を含み、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、編集されるべき標的部位のDNA配列と比較して編集された部分を含む二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられる。

２．態様１のシステムであって、第１のプライム編集因子複合体、第２のプライム編集因子複合体、または第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。

３．態様１または２のシステムであって、第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体が同じプライム編集因子を含む。

４．態様１または２のシステムであって、第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体が、異なるプライム編集因子を含む。

５．態様１～４のいずれか１つのシステムであって、napDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである。

６．態様１～５のいずれか１つのシステムであって、napDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、Cas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。

７．態様１～４のいずれか１つのシステムであって、napDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、CasX、CasY、およびアルゴノートからなる群から選択される。

８．態様１～７のいずれか１つのシステムであって、napDNAbpがニッカーゼ活性を有する。

９．態様１～４のいずれか１つのシステムであって、napDNAbpが、配列番号１８～８８のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号１８～８８のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

１０．態様１～９のいずれか１つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドが逆転写酵素である。

１１．態様１～１０のいずれか１つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドが、配列番号８９～１００、１０５～１２２、１２８～１２９、１３２、１３９、１４３、１４９、１５４、１５９、および７００～７６６のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号８９～１００、１０５～１２２、１２８～１２９、および１３２のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

１２．態様１～１１のいずれか１つのシステムであって、プライム編集因子が、さらに、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを連結するリンカーを含む。

１３．態様１２のシステムであって、リンカーが、配列番号１６６～１７７のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号１６６～１７７のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

１４．態様１２または１３のシステムであって、リンカーが、長さが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アミノ酸である。

１５．態様１～１４のいずれか１つのシステムであって、pegRNAが、配列番号３２５～３３０、４９９～５０５、１０１～１０４、１８１～１８３、および２２３～２４４のいずれか１つのヌクレオチド配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号３２５～３３０、４９９～５０５、１０１～１０４、１８１～１８３、および２２３～２４４のいずれか１つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

１６．態様１～１５のいずれか１つのシステムであって、第１のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第１鎖上の第１の結合部位に結合する。

１７．態様１～１６のいずれか１つのシステムであって、第２のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第２

鎖上の第2の結合部位に結合する。

18．態様17のシステムであって、それによって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のpegRNAのスペーサー配列の結合が、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれのnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

19．態様18のシステムであって、第1および第2の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める。

20．態様19のシステムであって、第1および第2の結合部位の間の一続きの領域が、長さが少なくとも10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

21．態様19のシステムであって、一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる。

22．態様1～21のいずれか1つのシステムであって、DNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

23．態様1～22のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する。

24．態様1～22のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する。

25．態様1～24のいずれか1つのシステムであって、相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99％、少なくとも95％、少なくとも90％、少なくとも85％、少なくとも80％、少なくとも75％、少なくとも70％、少なくとも65％、少なくとも60％、少なくとも55％、少なくとも50％、少なくとも45％、少なくとも40％、少なくとも35％、少なくとも30％、少なくとも25％、少なくとも20％、少なくとも15％、または少なくとも10％である。

26．態様25のシステムであって、相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドであり、所望のDNA配列およびその相補物の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである。

27．態様25のシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、編集された部分を含む二重鎖を形成する。

28．態様1～27のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である。

29．態様21のシステムであって、編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

30．編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステムであって、前記のシステムが:

(a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

(b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、二本鎖DNA配列の第1鎖および第2鎖が互いに対して相補的である。

31．態様30のシステムであって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。

32．態様30のシステムであって、第1および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む。

33．態様30のシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、編集された部分を含む二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられる。

34．態様30のシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および/または第2の一本鎖配列が、標的部位のDNA配列と比較して配列相同性を含まない。

35．態様30のシステムであって、第1のPEgRNAが、さらに、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、および第1のプライマー結合部位を含み、第2のPEgRNAが、さらに、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、および第2のプライマー結合部位を含む。

36．態様30～35のいずれか1つのシステムであって、第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む。

37．態様30～35のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドおよびRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドが同じである。

38．態様30～37のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである。

39．態様30～38のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、Cas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。

40．態様30～39のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のnapDNAbpが、Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12c、CasX、CasY、およびアルゴノートからなる群から選択される。

41．態様30～40のいずれか1つのシステムであって、napDNAbpがニッカーゼ活性を有する。

42．態様30～41のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のnapDNAbpが、配列番号18～88のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号18～88のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

43．態様30～42のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが逆転写酵素である。

44．態様30～43のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1および/または第2のポリペプチドが、配列番号89～100、105～122、128～129、132、139、143、149、154、159、および700～766のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号89～100、105～122、128～129、および132のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

45．態様30～44のいずれか1つのシステムであって、第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチ

ドとを連結するリンカーを含み;および/または第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含む。

46．態様45のシステムであって、リンカーが、配列番号166～177のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号166～177のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

47．態様45または46のシステムであって、リンカーが、長さが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アミノ酸である。

48．態様30～47のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のpegRNAが、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

49．態様30～48のいずれか1つのシステムであって、第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する。

50．態様49のシステムであって、第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する。

51．態様50のシステムであって、それによって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、第1および第2のプライム編集因子複合体のそれぞれの第1および/または第2のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

52．態様51のシステムであって、第1および第2の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める。

53．態様52のシステムであって、第1および第2の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレ

オチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

54．態様53のシステムであって、一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる。

55．態様30～54のいずれか1つのシステムであって、第1および/または第2のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも1

00ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

56．態様30～55のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する。

57．態様30～55のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する。

58．態様30～57のいずれか1つのシステムであって、相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99％、少なくとも95％、少なくとも90％、少なくとも85％、少なくとも80％、少なくとも75％、少なくとも70％、少なくとも65％、少なくとも60％、少なくとも55％、少なくとも50％、少なくとも45％、少なくとも40％、少なくとも35％、少なくとも30％、少なくとも25％、少なくとも20％、少なくとも15％、または少なくとも10％である。

59．態様30～58のいずれか1つのシステムであって、相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌク

レオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

60．態様30～59のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する。

61．態様30～60のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である。

62．態様54のシステムであって、編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

63．態様1～62のいずれかのシステムをコードするポリヌクレオチド。

64．態様1～62のいずれか1つの第1および第2のプライム編集因子をコードするポリヌクレオチド。

65．態様1～29のいずれか1つの第1および/または第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

66．態様30～62のいずれか1つの第1および/または第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

67．態様1～29のいずれか1つの第1および第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

68．態様30～62のいずれか1つの第1および第2のpegRNAをコードするポリヌクレオチド。

69．態様63～68のいずれか1つのポリヌクレオチドを含むベクター。

70．態様63～69のいずれか1つのポリヌクレオチドまたは態様64のベクターを含む細胞。

71．医薬組成物であって、態様63～68のいずれか1つのポリヌクレオチド、態様69のベクター、または態様70の細胞、および医薬賦形剤を含む。

72．キットであって、態様63～69のいずれかのポリヌクレオチドまたは態様70のベクター、および編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するための説明書を含む。

73．標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法であって、前記の方法が、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、前記のペアが:

a．i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

b．i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体、

を含み;

第1のプライム編集因子複合体が、第1の結合部位に対して相補的な配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第2のプライム編集因子複合体が、第2の結合部位に対して相補的な配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、編集を含む二重鎖を形成し;

二重鎖が、二本鎖ＤＮＡ配列のニックを入れられた第１および第２の相補鎖を置き換える。

７４．態様７３の方法であって、第１のプライム編集因子複合体、第２のプライム編集因子複合体、または第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、ｎａｐＤＮＡｂｐとＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。

７５．態様７３の方法であって、第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む。

７６．態様７３の方法であって、第１のプライム編集因子複合体および第２のプライム編集因子複合体が、異なるプライム編集因子を含む。

７７．態様７３～７６のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｎａｐＤＮＡｂｐがＣａｓ９ドメインまたはそのバリアントである。

７８．態様７３～７７のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｎａｐＤＮＡｂｐが、ヌクレアーゼ活性Ｃａｓ９ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Ｃａｓ９ドメイン、Ｃａｓ９ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。

７９．態様７３～７６のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｎａｐＤＮＡｂｐが:Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２ｅ、Ｃａｓ１２ｄ、Ｃａｓ１２ａ、Ｃａｓ１２ｂ１、Ｃａｓ１３ａ、Ｃａｓ１２ｃ、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、およびアルゴノートからなる群から選択される。

８０．態様７３～７９のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｎａｐＤＮＡｂｐがニッカーゼ活性を有する。

８１．態様７３～８０のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｎａｐＤＮＡｂｐが、配列番号１８～８８のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号１８～８８のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

８２．態様７３～８１のいずれか１つの方法であって、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する第１および/または第２のポリペプチドが逆転写酵素である。

８３．態様７３～８２のいずれか１つの方法であって、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する第１および/または第２のポリペプチドが、配列番号８９～１００、１０５～１２２、１２８～１２９、１３２、１３９、１４３、１４９、１５４、１５９、および７００～７６６のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号８９～１００、１０５～１２２、１２８～１２９、および１３２のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

８４．態様７３～８３のいずれか１つの方法であって、第１のプライム編集因子が、さらに、第１のｎａｐＤＮＡｂｐとＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する第１のポリペプチドとを連結するリンカーを含み、および/または第２のプライム編集因子が、さらに、第２のｎａｐＤＮＡｂｐとＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有する第２のポリペプチドとを連結するリンカーを含む。

８５．態様８４の方法であって、リンカーが、配列番号１６６～１７７のいずれか１つのアミノ酸配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号１６６～１７７のいずれか１つに対して有するアミノ酸配列を含む。

８６．態様８４または８５の方法であって、リンカーが、長さが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アミノ酸である。

８７．態様７３～８６のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のｐｅｇＲＮＡが、配列番号３２５～３３０、４９９～５０５、１０１～１０４、１８１～１８３、および２２３～２４４のいずれか１つのヌクレオチド配列、または少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、もしくは９９％の配列同一性を配列番号３２５～３３０、４９９～５０５、１０１～１０４、１８１～１８３、および２２３～２４４のいずれか１つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

８８．態様７３～８７のいずれか１つの方法であって、第１および/または第２のＰＥｇＲＮＡが

、配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号325～330、499～505、101～104、181～183、および223～244のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

89．態様73～88のいずれか1つの方法であって、第1のプライム編集因子複合体の第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する。

90．態様73～89のいずれか1つの方法であって、第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する。

91．態様90の方法であって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体の第1および第2のスペーサー配列の結合が、各第1および第2のプライム編集因子複合体のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

92．態様91の方法であって、第1および第2の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める。

93．態様92の方法であって、第1および第2の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌク

レオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

94．態様92または93の方法であって、一続きの領域が、編集された部分を含む二重鎖によって置き換えられるようになる。

95．態様73～94のいずれか1つの方法であって、第1および/または第2のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

96．態様73～95のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が同じ長さを有する。

97．態様73～95のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が異なる長さを有する。

98．態様73～97のいずれか1つの方法であって、相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99％、少なくとも95％、少なくとも90％、少なくとも85％、少なくとも80％、少なくとも75％、少なくとも70％、少な

くとも65％、少なくとも60％、少なくとも55％、少なくとも50％、少なくとも45％、少なくとも40％、少なくとも35％、少なくとも30％、少なくとも25％、少なくとも20％、少なくとも15％、または少なくとも10％である。

99．態様73～98のいずれか1つの方法であって、相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドであり、所望のDNA配列およびその相補物の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである。

100．態様73～99のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する。

101．態様73～100のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である。

102．態様94の方法であって、編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

103．態様73～102のいずれか1つの方法であって、二重鎖が、1以上のリコンビナーゼ部位を含む編集を含む。

104．態様103の方法であって、さらに、編集されるべき標的部位のDNA配列のリコンビナーゼによって媒介される編集を促進するためのリコンビナーゼを提供することを含む。

105．二重プライム編集への使用のためのpegRNAのペアであって、ペアが:

a．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)であって、第1のPEgRNAが、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、第1のDNA合成鋳型、および第1のプライマー結合部位を含み、第1のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第1の一本鎖DNA配列をコードする;

b．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)であって、第2のPEgRNAが、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、第2のDNA合成鋳型、および第2のプライマー結合部位を含み、第2のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第2の一本鎖DNA配列をコードし、第2の一本鎖DNA配列が第1の一本鎖DNA配列に対する相補性の領域を含む、

を含む。

106．態様105のpegRNAのペアであって、

第1のPEgRNAが、構造:

5'-[第1のgRNAスペーサー配列]-[第1のgRNAコア]-[第1のDNA合成鋳型]-[第1のプライマー結合部位]-3'

を含み;

第2のPEgRNAが、構造:

5'-[第2のgRNAスペーサー配列]-[第2のgRNAコア]-[第2のDNA合成鋳型]-[第2のプライマー結合部位]-3'

を含む。

107．態様105または106のpegRNAのペアであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列に取り入れられる。

108．態様107のpegRNAのペアであって、二重鎖の取り入れが標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

109．態様108のpegRNAのペアであって、挿入が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド

、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

110．態様109のpegRNAのペアであって、欠失が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少な

くとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである。

111．態様110のpegRNAのペアであって、置き換えが、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである。

112．態様105～111のいずれか1つのpegRNAのペアをコードするポリヌクレオチド。

113．細胞においてpegRNAのペアを発現するための態様112のポリヌクレオチドを含むベクター。

114．態様113のベクターを含む細胞。
115．医薬組成物であって、態様105～111のいずれか1つのpegRNAのペア、態様113のベクター、または態様114の細胞、および医薬賦形剤を含む。
116．プライム編集因子複合体のペアであって、前記のペアが:
a．i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および
ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の鎖上の第1の標的配列に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、
を含む第1のプライム編集因子複合体;
b．i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の標的配列に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体、
を含む。
117．態様116のプライム編集因子複合体のペアであって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、または第1のプライム編集因子複合体および第2のプライム編集因子複合体両方のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。
118．態様116または117のプライム編集因子複合体のペアをコードするポリヌクレオチド。
119．細胞においてプライム編集因子複合体のペアを発現するための態様118のポリヌクレオチドを含むベクター。
120．態様119のベクターを含む細胞。
121．医薬組成物であって、態様116もしくは117のプライム編集因子複合体のペア、態様119のベクター、または態様120の細胞、および医薬賦形剤を含む。
122．態様1～62のいずれか1つのシステムまたは態様68～98のいずれか1つの方法であって、編集された部分を含む二重鎖の取り入れが標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。
123．態様122のシステムまたは方法であって、挿入がペプチドタグである。
124．態様123のシステムまたは方法であって、ペプチドタグが、ポリヒスチジン(例えばHHHHHH)(配列番号252～262)、FLAG(例えばDYKDDDDK)(配列番号2)、V5(例えばGKPIPNPLLGLDST)(配列番号3)、GCN4、HA(例えばYPYDVPDYA)(配列番号5)、Myc(例えばEQKLISEED)(配列番号6)、またはGSTである。
125．態様123のシステムまたは方法であって、ペプチドタグが、配列番号1～6、245～249、252～262、264～273、275～276、281、278～288、および622からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。
126．態様122のシステムまたは方法であって、挿入が免疫エピトープタグである。
127．態様126のシステムまたは方法であって、免疫エピトープタグが:テタヌストキソイド(配列番号396);ジフテリア毒素変異体CRM197(配列番号630);ムンプス免疫エピトープ1(配列番号400);ムンプス免疫エピトープ2(配列番号402);ムンプス免疫エピトープ3(配列番号404);風疹ウイルス(配列番号406);ヘマグルチニン(配列番号408);ノイラミニダーゼ(配列番号410);TAP1(配列番号412);TAP2(配列番号414);HLAクラスIに対するヘマグルチニンエピトープ(配列番号416);HLAクラスIに対するノイラミニダーゼエピトープ(配列番号418);HLAクラスIIに対するヘマグルチニンエピトープ(配列番号420);HLAクラスIIに対するノイラミニダーゼエピトープ(配列番号422);ヘマグルチニンエピトープH5N1結合HLAクラスIおよびクラスII(配列番号424);ならびにノイラミニダーゼエピトープH5N1結合HLAクラスIおよびクラスII(配列番号426)からなる群から選択される。

128．態様122のシステムまたは方法であって、挿入が二量体化ドメインである。

129．態様128のシステムまたは方法であって、二量体化ドメインが、配列番号488のFKBP12、配列番号489のFKBP12-F36V、または配列番号490もしくは493～494のシクロフィリンの低分子結合ドメインである。

130．編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するためのシステムであって、システムが:

a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

b)iii．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

iv．編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

c)iii．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および

iv．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、

を含む第3のプライム編集因子複合体;

d)iii．第4の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および

iv．編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、

を含む第4のプライム編集因子複合体;

を含み、

第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、第3のPEgRNAが、第3の一本鎖DNA配列をコードする第3のDNA合成鋳型を含み、第4のPEgRNAが、第4の一本鎖DNA配列をコードする第4のDNA合成鋳型を含み;

第1および第3の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含み、第2および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む。

131．1以上の二本鎖DNA配列を編集するためのシステムであって、システムが:

e)iii．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

iv．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

f)v．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

vi．編集されるべき第1の標的部位の第1の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

g)v．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および

vi．a編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、
を含む第3のプライム編集因子複合体;
h)v．第4の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および
vi．編集されるべき第2の標的部位の第2の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、
を含む第4のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のPEgRNAが、第1の一本鎖DNA配列をコードする第1のDNA合成鋳型を含み、第2のPEgRNAが、第2の一本鎖DNA配列をコードする第2のDNA合成鋳型を含み、第3のPEgRNAが、第3の一本鎖DNA配列をコードする第3のDNA合成鋳型を含み、第4のPEgRNAが、第4の一本鎖DNA配列をコードする第4のDNA合成鋳型を含み;
第1および第3の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含み;第2および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、互いに対する相補性の領域を含む。
132．態様130または131のシステムであって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および/または第4のプライム編集因子複合体のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。
133．態様129～132のいずれか1つのシステムであって、
(i)第1のPEgRNAが、さらに、第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、および第1のプライマー結合部位を含み;
(ii)第2のPEgRNAが、さらに、第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、および第2のプライマー結合部位を含み;
(iii)第3のPEgRNAが、さらに、第3のスペーサー配列、第3のgRNAコア、および第3のプライマー結合部位を含み;
(iv)第4のPEgRNAが、さらに、第4のスペーサー配列、第4のgRNAコア、第4のDNA合成鋳型、および第4のプライマー結合部位を含む。
134．態様131のシステムであって、第1および第3の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が二重鎖を形成する。
135．態様134のシステムであって、第1のスペーサー配列が、編集されるべき第1の標的部位の上流の第1の二本鎖DNA配列の第1の結合部位に結合し、第2のスペーサー配列が、編集されるべき第1の標的部位の下流の第1の二本鎖DNA配列上の第2の結合部位に結合する。
136．態様134または135のシステムであって、第3のスペーサー配列が、編集されるべき第2の標的部位の上流の第2の二本鎖DNA配列の第1の結合部位に結合し、第4のスペーサー配列が、編集されるべき第2の標的部位の下流の第2の二本鎖DNA配列上の第2の結合部位に結合する。
137．態様134～136のいずれか1つのシステムであって、第1および第2の結合部位が、第1の二本鎖DNAの第1の一続きの領域の2つの端を定める。
138．態様134～137のいずれか1つのシステムであって、第3および第4の結合部位が、第2の二本鎖DNAの第2の一続きの領域の2つの端を定める。
139．態様138のシステムであって、第1および第2の結合部位または第3および第4の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、

少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

140.態様134～140のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する。

141．態様140のシステムであって、二重鎖が第1の二本鎖DNAおよび/または第2の二本鎖DNAに組み込まれる。

142．態様134～141のいずれか1つのシステムであって、システムが、第1の二本鎖DNA上への第2の一続きの領域による第1の一続きの領域の置き換えをもたらす。

143．態様134～141のいずれか1つのシステムであって、システムが、第1の二本鎖DNAおよび第2の二本鎖DNAの間の第1の一続きの領域および第2の一続きの領域の交換をもたらす。

144．態様130～143のいずれか1つのシステムであって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および第4のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む。

145．態様130～144のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1、第2、第3、および第4のポリペプチドが同じである。

146．態様130～145のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである。

147．態様130～146のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。

148．態様130～147のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13

a、Cas12c、およびアルゴノートからなる群から選択される。

149．態様130～148のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがニッカーゼ活性を有する。

150．態様130～149のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、配列番号2～65のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号2～65のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

151．態様130～150のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが逆転写酵素である。

152．態様130～151のいずれか1つのシステムであって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが、配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

153．態様130～152のいずれか1つのシステムであって、

(i)第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;

(ii)第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;

(iii)第3のプライム編集因子が、さらに、第3のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第3のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;および/または

(iv)第4のプライム編集因子が、さらに、第4のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第4のポリペプチドとを連結するリンカーを含む。

154．態様153のシステムであって、リンカーが、配列番号119～128のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号119～128のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

155．態様153または154のシステムであって、リンカーが、長さが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アミノ酸である。

156．態様130～155のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のPEgRNAが、配列番号192～203のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号192～203のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

157．態様130～156のいずれか1つのシステムであって、第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する。

158．態様130～157のいずれか1つのシステムであって、第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する。

159．態様130～158のいずれか1つのシステムであって、第3のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する。

160．態様130～159のいずれか1つのシステムであって、第4のプライム編集因子複合体の第4のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する。

161．態様160のシステムであって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、各第1および第2のプライム編集因子複合体の第1および/または第2のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位の

ニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

162．態様161のシステムであって、PAM配列の存在下における第3および第4のプライム編集因子複合体のスペーサー配列の結合が、各第3および第4のプライム編集因子複合体の第3および/または第4のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

163．態様160または162のシステムであって、第1および第3の結合部位または第2および第4の結合部位が、二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める。

164．態様163のシステムであって、第1および第3の結合部位または第2および第4の結合部位の間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

165．態様130～164のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の相補性の領域ならびに/または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する。

166．態様164または165のシステムであって、一続きの領域が二重鎖によって置き換えられるようになる。

167．態様164または165のシステムであって、二重鎖が標的部位の二本鎖DNAに組み込まれる。

168．態様130～167のいずれか1つの態様のシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

169．態様130～168のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、同じ長さを有する。

170．態様130～168のいずれか1つのシステムであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、異なる長さを有する。

171．態様130～170のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列または第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少な

くとも75％、少なくとも70％、少なくとも65％、少なくとも60％、少なくとも55％、少なくとも50％、少なくとも45％、少なくとも40％、少なくとも35％、少なくとも30％、少なくとも25％、少なくとも20％、少なくとも15％、または少なくとも10％である。

172．態様130～171のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および/または第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドであり、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列ならびに第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の長さに等しいかまたはそれ未満かどちらかである。

173．態様130～172のいずれか1つのシステムであって、第1、第2、第3、および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である。

174．態様167のシステムであって、編集された部分を含む二重鎖の組み込みが標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

175．態様130～174のいずれか1つの第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子をコードするポリヌクレオチド。

176．態様130～174のいずれかの第1、第2、第3、および第4のPEgRNAをコードするポリヌクレオチド。

177．態様175または176のポリヌクレオチドを含むベクター。

178．態様175もしくは176のポリヌクレオチドまたは態様177のベクターを含む細胞。

179．医薬組成物であって、態様175もしくは176のポリヌクレオチド、態様177のベクター、または態様178の細胞、および医薬賦形剤を含む。

180．キットであって、態様175もしくは176のポリヌクレオチドまたは態様177のベクター、および編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列の両鎖を同時編集するための説明書を含む。

181．標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法であって、方法が、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、ペアが:

(a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の標的配列に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

(b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の標的配列に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

(c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第3の標的配列に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、

を含む第3のプライム編集因子複合体;

(d)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第4の標的配列に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、

を含む第4のプライム編集因子複合体;

を含み、

第1のプライム編集因子複合体が、第1の標的配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第2のプライム編集因子複合体が、第2の標的配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第3のプライム編集因子複合体が、第3の標的配列における第3のニックと、第3のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第3の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第4のプライム編集因子複合体が、第4の標的配列における第4のニックと、第4のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第4の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換え;
第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換える。

182．態様181の方法であって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および/または第4のプライム編集因子複合体のプライム編集因子が、napDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチドとを含む融合タンパク質である。

183．態様181または182の方法であって、第1のプライム編集因子複合体、第2のプライム編集因子複合体、第3のプライム編集因子複合体、および第4のプライム編集因子複合体が、同じプライム編集因子を含む。

184．態様181または182の方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のプライム編集因子複合体が、異なるプライム編集因子を含む。

185．態様181～184のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがCas9ドメインまたはそのバリアントである。

186．態様181～185のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、ヌクレアーゼ活性Cas9ドメイン、ヌクレアーゼ不活性型Cas9ドメイン、もしくはCas9ニッカーゼドメイン、またはそのバリアントである。

187．態様181～184のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが:Cas9、Cas12e、Cas12d、Cas12a、Cas12b1、Cas13a、Cas12cからなる群から選択される。

188．態様181～187のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpがニッカーゼ活性を有する。

189．態様181～188のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のnapDNAbpが、配列番号2～65のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号2～65のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

190．態様181～189のいずれか1つの方法であって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが逆転写酵素である。

191．態様181～190のいずれか1つの方法であって、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1、第2、第3、および/または第4のポリペプチドが、配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号37、68～79、82～98、81、98、および110のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

192．態様181～191のいずれか1つの方法であって、
(i)第1のプライム編集因子が、さらに、第1のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第1のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;
(ii)第2のプライム編集因子が、さらに、第2のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第2のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;
(iii)第3のプライム編集因子が、さらに、第3のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第3のポリペプチドとを連結するリンカーを含み;および/または
(iv)第4のプライム編集因子が、さらに、第4のnapDNAbpとRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有する第4のポリペプチドとを連結するリンカーを含む。

193．態様192の方法であって、リンカーが、配列番号119～128のいずれか1つのアミノ酸配列、または少なくとも80%、85%、90%、95%、もしくは99%の配列同一性を配列番号119～128のいずれか1つに対して有するアミノ酸配列を含む。

194．態様192または193の方法であって、リンカーが、長さが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アミノ酸である。

195．態様181～191のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のPEgRNAが、配列番号192～203のいずれか1つのヌクレオチド配列、または少なくとも80％、85％、90％、95％、もしくは99％の配列同一性を配列番号192～203のいずれか1つに対して有するヌクレオチド配列を含む。

196．態様181～195のいずれか1つの方法であって、第1のプライム編集因子複合体の第1のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する。

197．態様181～196のいずれか1つの方法であって、第2のプライム編集因子複合体の第2のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する。

198．態様181～197のいずれか1つの方法であって、第3のプライム編集因子複合体の第3のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結合する。

199．態様181～198のいずれか1つの方法であって、第4のプライム編集因子複合体の第4のスペーサー配列が、編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する。

200．態様197の方法であって、PAM配列の存在下における第1および第2のプライム編集因子複合体の第1および第2のスペーサー配列の結合が、各第1および第2のプライム編集因子複合体のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

201．態様199の方法であって、PAM配列の存在下における第3および第4のプライム編集因子複合体の第3および第4のスペーサー配列の結合が、各第3および第4のプライム編集因子複合体のnapDNAbpによって、各鎖上のPAM配列に対して近位のニック部位において、それぞれ第1および第2鎖のニック入れをもたらす。

202．態様200または201の方法であって、第1および第2の結合部位ならびに/または第3および第4の結合部位が、編集されるべき標的部位を含む二本鎖DNAの一続きの領域の2つの端を定める。

203．態様202の方法であって、第1および第2の結合部位間の一続きの領域ならびに/または第3および第4の結合部位間の一続きの領域が、長さが最小の10核酸塩基対、少なくとも11核酸塩基対、少なくとも12核酸塩基対、少なくとも13核酸塩基対、少なくとも14核酸塩基対、少なくとも15核酸塩基対、少なくとも16核酸塩基対、少なくとも17核酸塩基対、少なくとも18核酸塩基対、少なくとも19核酸塩基対、少なくとも20核酸塩基対、少なくとも21核酸塩基対、少なくとも22核酸塩基対、少なくとも23核酸塩基対、少なくとも24核酸塩基対、少なくとも25核酸塩基対、少なくとも26核酸塩基対、少なくとも27核酸塩基対、少なくとも28核酸塩基対、少なくとも29核酸塩基対、少なくとも30核酸塩基対、少なくとも31核酸塩基対、少なくとも32核酸塩基対、少なくとも33核酸塩基対、少なくとも34核酸塩基対、少なくとも35核酸塩基対、少なくとも36核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも37核酸塩基対、少なくとも38核酸塩基対、少なくとも39核酸塩基対、または少なくとも40核酸塩基対、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド

、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

204．態様202または203の方法であって、一続きの領域が二重鎖によって置き換えられるようになる。

205．態様181～204のいずれか1つの方法であって、第1、第2、第3、および/または第4のDNA合成鋳型が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少な

くとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

206．態様181～205のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、同じ長さを有する。

207．態様181～206のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖のDNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、異なる長さを有する。

208．態様181～207のいずれか1つの方法であって、相補性の領域が、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の全長の少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、少なくとも15%、または少なくとも10%である。

209．態様181～208のいずれか1つの方法であって、相補性の領域が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87

ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

210．態様181～209のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の相補性の領域が、二重鎖を形成する。

211．態様181～210のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、それぞれが、3'端を有する一本鎖DNA鎖である。

212．態様204の方法であって、編集された部分を含む二重鎖による一続きの領域の置き換えが、標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。

213．態様181～212のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、標的DNA配列の端にあり、第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が、同じ標的DNA配列の対向する端にある。

214．態様213の方法であって、標的DNA配列が逆位させられる。

215．態様181～214のいずれか1つの方法であって、さらに、環状DNAドナーを提供することを含む。

216．態様215の方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列が、標的DNA配列の対向する端にあり、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が環状DNAドナー上にある。

217．態様216の方法であって、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の間の環状DNAドナーのある部分が、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の間の標的配列を置き換える。

218．態様181～214のいずれか1つの方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列が第1の核酸分子上にあり、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が第2の核酸分子上にある。

219．態様218の方法であって、第1の一本鎖DNA配列および第3の一本鎖DNA配列の間の第1の核酸分子のある部分が、第2の核酸分子に組み込まれ、第2の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列の間の第2の核酸分子のある部分が、第1の核酸分子に組み込まれる。

220．態様218または219の方法であって、第1の核酸分子が第1の染色体であり、第2の核酸分子が第2の染色体である。

221．多重フラッププライム編集への使用のためのPEgRNAのセットであって、PEgRNAが:

(a)編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)であって、第1のPEgRNAが第1のスペーサー配列、第1のgRNAコア、第1のDNA合成鋳型、および第1のプライマー結合部位を含み、第1のDNA合成鋳型が第1の一本鎖DNA配列をコードする;

(b)編集されるべき標的部位の上流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)であって、第2のPEgRNAが第2のスペーサー配列、第2のgRNAコア、第2のDNA合成鋳型、および第2のプライマー結合部位を含み、第2のDNA合成鋳型が、編集された部分を含む第2の一本鎖DNA配列をコードし、第2の一本鎖DNA配列が第1の一本鎖DNA配列に対して相補的である、

(c)編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第1鎖上の第3の結合部位に結

合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)であって、第3のPEgRNAが第3のスペーサー配列、第3のgRNAコア、第3のDNA合成鋳型、および第3のプライマー結合部位を含み、第3のDNA合成鋳型が第3の一本鎖DNA配列をコードする;
(d)編集されるべき標的部位の下流の二本鎖DNA配列の第2鎖上の第4の結合部位に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)であって、第4のPEgRNAが第4のスペーサー配列、第4のgRNAコア、第4のDNA合成鋳型、および第4のプライマー結合部位を含み、第4のDNA合成鋳型が第4の一本鎖DNA配列をコードし、第4の一本鎖DNA配列が第3の一本鎖DNA配列に対する相補性の領域を含む、
を含む。
222．態様221のPEgRNAのセットであって、
第1のPEgRNAが、構造:
5'-[第1のgRNAスペーサー配列]-[第1のgRNAコア]-[第1のDNA合成鋳型]-[第1のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第2のPEgRNAが、構造:
5'-[第2のgRNAスペーサー配列]-[第2のgRNAコア]-[第2のDNA合成鋳型]-[第2のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第3のPEgRNAが、構造:
5'-[第3のgRNAスペーサー配列]-[第3のgRNAコア]-[第3のDNA合成鋳型]-[第3のプライマー結合部位]-3'
を含み;
第4のPEgRNAが、構造:
5'-[第4のgRNAスペーサー配列]-[第4のgRNAコア]-[第4のDNA合成鋳型]-[第4のプライマー結合部位]-3'
を含む。
223．態様221または222のPEgRNAのセットであって、第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列ならびに/または第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列が二重鎖を形成し、これが、編集されるべき標的部位の二本鎖DNA配列に取り入れられるようになる。
224．態様221～223のいずれか1つのPEgRNAのセットであって、二重鎖の取り入れが標的部位のDNAの挿入、欠失、または置き換えをもたらす。
225．態様224のPEgRNAのセットであって、挿入が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、

少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、または少なくとも110ヌクレオチドである。

226．態様224のPEgRNAのセットであって、欠失が、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なく

とも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである。

227．態様224のPEgRNAのセットであって、置き換えが、長さが少なくとも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、少なくとも26ヌクレオチド、少なくとも27ヌクレオチド、少なくとも28ヌクレオチド、少なくとも29ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも31ヌクレオチド、少なくとも32ヌクレオチド、少なくとも33ヌクレオチド、少なくとも34ヌクレオチド、少なくとも35ヌクレオチド、少なくとも36ヌクレオチド、少なくとも37ヌクレオチド、少なくとも38ヌクレオチド、少なくとも39ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも41ヌクレオチド、少なくとも42ヌクレオチド、少なくとも43ヌクレオチド、少なくとも44ヌクレオチド、少なくとも45ヌクレオチド、少なくとも46ヌクレオチド、少なくとも47ヌクレオチド、少なくとも48ヌクレオチド、少なくとも49ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも51ヌクレオチド、少なくとも52ヌクレオチド、少なくとも53ヌクレオチド、少なくとも54ヌクレオチド、少なくとも55ヌクレオチド、少なくとも56ヌクレオチド、少なくとも57ヌクレオチド、少なくとも58ヌクレオチド、少なくとも59ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも61ヌクレオチド、少なくとも62ヌクレオチド、少なくとも63ヌクレオチド、少なくとも64ヌクレオチド、少なくとも65ヌクレオチド、少なくとも66ヌクレオチド、少なくとも67ヌクレオチド、少なくとも68ヌクレオチド、少なくとも69ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも71ヌクレオチド、少なくとも72ヌクレオチド、少なくとも73ヌクレオチド、少なくとも74ヌクレオチド、少なくとも75ヌクレオチド、少なくとも76ヌクレオチド、少なくとも77ヌクレオチド、少なくとも78ヌクレオチド、少なくとも79ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも81ヌクレオチド、少なくとも82ヌクレオチド、少なくとも83ヌクレオチド、少なくとも84ヌクレオチド、少なくとも85ヌクレオチド、少なくとも86ヌクレオチド、少なくとも87ヌクレオチド、少なくとも88ヌクレオチド、少なくとも89ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、少なくとも91ヌクレオチド、少なくとも92ヌクレオチド、少なくとも93ヌクレオチド、少なくとも94ヌクレオチド、少なくとも95ヌクレオチド、少なくとも96ヌクレオチド、少なくとも97ヌクレオチド、少なくとも98ヌクレオチド、少なくとも99ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも101ヌクレオチド、少なくとも102ヌクレオチド、少なくとも103ヌクレオチド、少なくとも104ヌクレオチド、少なくとも105ヌクレオチド、少なくとも106ヌクレオチド、少なくとも107ヌクレオチド、少なくとも108ヌクレオチド、少なくとも109ヌクレオチド、もしくは少なくとも110ヌクレオチド、またはより多くである。

228．態様221～227のいずれかのPEgRNAのセットをコードするポリヌクレオチド。

229．細胞において複数のPEgRNAを発現するための態様228のポリヌクレオチドを含むベクター。
230．態様229のベクターを含む細胞。
231．医薬組成物であって、態様221～227のいずれか1つの複数のPEgRNA、態様229のベクター、または態様230の細胞、および医薬賦形剤を含む。
232．細胞のゲノムを改変するための方法であって:
(i)ゲノムを二重フラッププライム編集システムと接触させ、前記のシステムが、標的部位の第1鎖上の第1のニック部位に第1の3'核酸フラップを組み入れることができる第1のプライム編集因子/pegRNA複合体、および標的部位の第2鎖上の第2のニック部位に第2の3'核酸フラップを組み入れることができる第2のプライム編集因子/pegRNA複合体を含み、
第1の3'核酸フラップおよび第2の3'核酸フラップが逆相補配列であり、これらが二重鎖を形成し、
二重鎖が第1のリコンビナーゼ部位を含み、
細胞が、第1および第2のニック部位の間に位置する内生二重鎖に代えて、標的部位に第1のリコンビナーゼ部位を含む二重鎖を組み入れること;
(ii)第2のリコンビナーゼ部位を含むドナー核酸と第1のリコンビナーゼ部位を接触させること;ならびに
(iii)第1および第2のリコンビナーゼ部位の間の組み換えができるリコンビナーゼとゲノムを接触させ、それによってゲノム上の標的部位にドナー核酸を取り入れること、
を含む。
【０９５４】
[9]方法
多重フラッププライム編集のための方法
一側面において、本開示は、標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法を提供し、前記の方法は、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、前記のペアは:
a．i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および
ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の結合部位に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、
を含む第1のプライム編集因子複合体;
b．i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および
ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の結合部位に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、
を含む第2のプライム編集因子複合体;
を含み、
第1のプライム編集因子複合体が、第1の結合部位に対して相補的な配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第2のプライム編集因子複合体が、第2の結合部位に対して相補的な配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;
第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列が、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、編集を含む二重鎖を形成し;
二重鎖が、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換える。
【０９５５】

別の側面において、本開示は、標的部位の二本鎖DNA配列の第1および第2の相補鎖を同時編集するための方法を提供し、方法は、二本鎖DNA配列をプライム編集因子複合体のペアと接触させることを含み、ペアは:

(a)i．第1の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第1のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第1のポリペプチドとを含む第1のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第1の標的配列に結合する第1のプライム編集ガイドRNA(第1のPEgRNA)、

を含む第1のプライム編集因子複合体;

(b)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第2のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第2のポリペプチドとを含む第2のプライム編集因子;および

ii．標的部位の上流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第2の標的配列に結合する第2のプライム編集ガイドRNA(第2のPEgRNA)、

を含む第2のプライム編集因子複合体;

(c)i．第3の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第3のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第3のポリペプチドとを含む第3のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第1鎖上の第3の標的配列に結合する第3のプライム編集ガイドRNA(第3のPEgRNA)、

を含む第3のプライム編集因子複合体;

(d)i．第2の核酸プログラム型DNA結合タンパク質(第4のnapDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を含む第4のポリペプチドとを含む第4のプライム編集因子;および

ii．標的部位の下流のゲノムDNA配列の第2鎖上の第4の標的配列に結合する第4のプライム編集ガイドRNA(第4のPEgRNA)、

を含む第4のプライム編集因子複合体;

を含み、

第1のプライム編集因子複合体は、第1の標的配列における第1のニックと、第1のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第1の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第2のプライム編集因子複合体は、第2の標的配列における第2のニックと、第2のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第2の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第3のプライム編集因子複合体は、第3の標的配列における第3のニックと、第3のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第3の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第4のプライム編集因子複合体は、第4の標的配列における第4のニックと、第4のニックによって形成される利用可能な5'端からの3'端を有する第4の一本鎖DNA配列の続く重合とを引き起こし;

第1の一本鎖DNA配列および第2の一本鎖DNA配列は、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖は、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換え;

第3の一本鎖DNA配列および第4の一本鎖DNA配列は、相補性の少なくともある領域に渡って逆相補であり、二重鎖を形成し、二重鎖は、二本鎖DNA配列のニックを入れられた第1および第2の相補鎖を置き換える。

【０９５６】

本明細書は多重フラッププライム編集システム(例えば、二重フラッププライム編集システムおよび四重フラッププライム編集システムを包含する)を記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と編集されない相補的なゲノムD

NA鎖への編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。二重フラッププライム編集システムにおいては、2つのPEgRNAがゲノム部位の対向する鎖を標的化するために用いられ、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図90)。四重フラッププライム編集システムでは、4つのPEgRNAが用いられ、4つの3'フラップの合成を導き、これらの2つが互いに対して相補的であり、これらの別の2つが互いに対して相補的である(図95、図96A、および図98A)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、多重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットする多重フラッププライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた、元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。

【0957】

古典的プライム編集のように、多重フラッププライム編集は多目的のかつ正確なゲノム編集方法である。これは、ポリメラーゼ(すなわち、napDNAbpとの融合タンパク質の形態の、または別様にトランスで提供される)と関連して働く核酸プログラム型DNA結合タンパク質(「napDNAbp」)を用いて、規定されたDNA部位に新たな遺伝情報を直接的に書き込み、プライム編集システムは、プライム編集(PE)ガイドRNA(「PEgRNA」)によってプログラムされる。これは、ガイドRNA上に(例えば、5'もしくは3'端に、またはガイドRNAの内部部分に)操作された伸長(DNAまたはRNAどちらか)によって、標的部位を規定することおよび置き換えDNA鎖の形態の所望の編集の合成の鋳型となること両方をする。所望の編集(例えば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内生鎖と同じ配列を共有する(それが所望の編集を包含することを例外とする)。DNA修復および/または複製機構によって、標的部位の内生鎖は、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。いくつかのケースでは、プライム編集は「探索-と-置き換え」ゲノム編集テクノロジーと考えられ得る。なぜなら、本願に記載される二重プライム編集因子は編集されるべき所望の標的部位を探索し位置付けるのみならず、同時に、所望の編集を含有する置き換え鎖をコードし、これが、対応する標的部位の内生DNA鎖に代えて組み入れられるからである。

【0958】

二重フラッププライム編集では、二本鎖DNA配列が標的部位において第1および第2のプライム編集因子複合体と接触させられる。各複合体は融合タンパク質およびPEgRNAを含む。いくつかの態様において、各融合タンパク質は、核酸プログラム型DNA結合タンパク質(napDNAbp)とRNA依存性DNAポリメラーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、逆転写酵素)とを含み、各PEgRNAはスペーサー配列、gRNAコア、DNA合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。各DNA合成鋳型は一本鎖DNA配列をコードし得、これは1以上のヌクレオチドの編集された部分を含み得る。コードされる2つの一本鎖DNA配列は互いに対して相補的であり得、二重鎖を形成し得、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられ得る。プライム編集因子複合体の種々の要素(例えば、融合タンパク質、napDNAbp、ポリメラーゼ、PEgRNAなど)は、本願において開示されるシステムの態様のいずれかを含み得る。

【0959】

四重フラッププライム編集では、二本鎖DNA配列が標的部位において第1、第2、第3、および第4のプライム編集因子複合体と接触させられる。各複合体は融合タンパク質およびPEgRNAを含む。いくつかの態様において、各融合タンパク質は、核酸プログラム

型ＤＮＡ結合タンパク質(ｎａｐＤＮＡｂｐ)とＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、逆転写酵素)とを含み、各ＰＥｇＲＮＡはスペーサー配列、ｇＲＮＡコア、ＤＮＡ合成鋳型、およびプライマー結合部位を含む。各ＤＮＡ合成鋳型は一本鎖ＤＮＡ配列をコードする。コードされる２つの一本鎖ＤＮＡ配列は互いに対して相補的であり得、二重鎖を形成し得、これが、編集されるべき標的部位に取り入れられ得る。プライム編集因子複合体の種々の要素(例えば、融合タンパク質、ｎａｐＤＮＡｂｐ、ポリメラーゼ、ＰＥｇＲＮＡなど)は、本願において開示されるシステムの態様のいずれかを含み得る。

【０９６０】

本願において提供される多重フラッププライム編集のための方法は、数々の適用に用いられ得る。例えば、それらは標的ＤＮＡ配列の逆位を容易化するために用いられ得る。この適用では、第１のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第２のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列が、標的ＤＮＡ配列の対向する端にあり、第３のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列は、同じ標的ＤＮＡ配列の対向する端にある。

【０９６１】

いくつかの態様において、本願において提供される多重フラッププライム編集のための方法は、さらに、環状ＤＮＡドナーを提供することを含み、これの一部が標的部位の二本鎖核酸に取り入れられ得る。この適用では、第１のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列が、標的ＤＮＡ配列の対向する端にあり、第２のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列が、環状ＤＮＡドナー上にある。第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４の一本鎖ＤＮＡ配列の間の環状ＤＮＡドナーの部分は二重鎖を形成し得、これが第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３の一本鎖ＤＮＡ配列の間の標的ＤＮＡ配列を置き換える。

【０９６２】

別の適用では、本願において提供される多重フラッププライム編集のための方法は、第１の核酸分子(例えば、第１の染色体)から第２の核酸分子(例えば、第２の染色体)への標的ＤＮＡ配列の転座を許す。この適用では、第１のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第３の一本鎖ＤＮＡ配列は、第１の核酸分子上にあり、第２のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４のＰＥｇＲＮＡのＤＮＡ合成鋳型によってコードされる第４の一本鎖ＤＮＡ配列は、第２の核酸分子上にある。第１の一本鎖ＤＮＡ配列および第３の一本鎖ＤＮＡ配列の間の第１の核酸分子の部分は第２の核酸分子に組み込まれ得、第２の一本鎖ＤＮＡ配列および第４の一本鎖ＤＮＡ配列の間の第２の核酸分子は第１の核酸分子に組み込まれる。

【０９６３】

他の方法

本開示は、例示されるとおり本願において提供される多重フラッププライム編集システムによって修正され得る点変異または他の変異(例えば、欠失、挿入、逆位、重複など)に関連するかまたはそれによって引き起こされるが、プリオン病(例えば、本願の例５)、トリヌクレオチドリピート伸長病(例えば、本願の例３)、またはＣＤＫＬ５欠損症(ＣＤＤ)(例えば、本願の例２３)に限定されない疾患と診断された対象の処置のための方法を提供する。

【０９６４】

実質的にいずれかの疾患を引き起こす遺伝子欠陥は、多重フラッププライム編集を用いることによって修復され得る。これは、適当なプライム編集因子融合タンパク質(ｎａｐＤＮＡｂｐおよびポリメラーゼ(例えば逆転写酵素を包含する)の選択と適当なＰＥｇＲＮＡのデザインとを包含し、(ａ)編集部位を含有する適当な標的ＤＮＡを標的化および(ｂ)ニック部位の直ちに下流の内生鎖を押し除けかつ置き換える所望の編集を包含するニック部位の３'

端からのDNAの一本鎖の合成のための鋳型を提供するようにデザインされる。多重フラッププライム編集は、限定なしに、(a)変異を修正する変化をヌクレオチド配列に組み入れる、(b)タンパク質およびRNAタグを組み入れる、(c)免疫エピトープを目当てのタンパク質に組み入れる、(d)誘導性の二量体化ドメインをタンパク質に組み入れる、(e)バイオ分子の活性を変改するための配列を組み入れまたは除去する、(f)特定の遺伝学的変化を導くためのリコンビナーゼ標的部位を組み入れる、および(g)エラーを起こしやすいRTを用いることによって標的配列に変異導入するために用いられ得る。

【０９６５】

障害を処置する方法には、早期のステップとして、本明細書に記載の方法に従う適当なPEgRNAおよびプライム編集因子融合タンパク質のデザインが関わり、これらは、考慮に入れられ得るいくつもの考慮事項を包含する。例えば:

(a)1以上の核酸塩基改変がプライム編集因子によって組み入れされることを望まれる標的配列、すなわちヌクレオチド配列;

(b)標的配列上のカットされる部位の位置付け、すなわち、プライム編集因子が一本鎖ニックを誘導して、ニックの1つの側に3'端RTプライマー配列およびニックの他の側に5'端の内生フラップ(これは究極的にはFEN1またはその等価物によって除去され、3'ssDNAフラップによって置き換えられる)を生出するであろう特定の核酸塩基位置。カットされた部位は3'端プライマー配列を生出し、これはRNA依存的なDNA重合の間にPE融合タンパク質(例えばRT酵素)のポリメラーゼによって伸長されるようになって、所望の編集を含有する3'ssDNAフラップを生出し、これが次いで標的配列上の5'内生DNAフラップを置き換える;

(c)利用可能なPAM配列(標準的なSpCas9 PAM部位、および拡張されたまたは異なるPAM特異性を有するCas9バリアントおよび等価物によって認識される非標準的なPAM部位を包含する);

(d)PAM鎖上の利用可能なPAM配列とカットされる部位の位置付けとの間の間隔;

(e)用いられるべき利用可能なプライム編集因子の具体的なCas9、Cas9バリアント、またはCas9等価物(これは部分的には利用可能なPAMによって記述される);

(f)プライマー結合部位の配列および長さ;

(g)編集鋳型の配列および長さ;

(h)相同アームの配列および長さ;

(i)スペーサー配列および長さ;ならびに

(j)gRNAコア配列。

【０９６６】

好適なPEgRNAと任意に第2部位ニッキングのためのニッキングsgRNAデザインガイドとが、説明書の次の例示のステップバイステップのセットによってデザインされ得る。これは上の考慮事項の1以上を考慮に入れる。ステップは図70A-70Iに示されている例を参照する。

1．標的配列および編集を定める。所望の編集(点変異、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせ)の位置付けを中心とした標的DNA領域(～200bp)の配列をリトリーブする。図70Aを見よ。

2．標的PAMを位置付ける。所望の編集位置付けに対して近位のPAMを同定する。PAMは所望の編集位置付けに対して近位のDNAのどちらかの鎖上に同定され得る。編集位置に近接するPAMが好ましいが(すなわち、ニック部位は編集位置から30nt未満である。または編集位置からニック部位まで29nt、28nt、27nt、26nt、25nt、24nt、23nt、22nt、21nt、20nt、19nt、18nt、17nt、16nt、15nt、14nt、13nt、12nt、11nt、10nt、9nt、8nt、7nt、6nt、5nt、4nt、3nt、もしくは2nt未満)、編集位置から≧30ntのニックを置くプロトスペーサーおよびPAMを用いて編集を組み入れることが可能である。図70Bを見よ。

3．ニック部位を位置付ける。考慮されている各PAMについて、対応するニック部位とどの鎖上かとを同定する。Sp Cas9 H840Aニッカーゼでは、切断はNGG PAMの5'

の第3および第4の塩基の間においてPAM含有鎖に生起する。全ての編集されるヌクレオチドはニック部位の3'に存在しなければならない。そのため、適当なPAMはPAM含有鎖上の標的の編集の5'にニックを置かなければならない。下で示される例では、2つの可能なPAMがある。単純のために、残りのステップはPAM 1のみを用いるPEgRNAのデザインを実証する。図70Cを見よ。

4．スペーサー配列をデザインする。Sp Cas9のプロトスペーサーはPAM含有鎖上のNGG PAMの5'の20ヌクレオチドに対応する。効率的なPol III転写開始はGが最初に転写されるヌクレオチドであることを要求する。プロトスペーサーの最初のヌクレオチドがGである場合には、PEgRNAのスペーサー配列は単純にプロトスペーサー配列である。プロトスペーサーの最初のヌクレオチドがGではない場合には、PEgRNAのスペーサー配列は、G、次にプロトスペーサー配列である。図70Dを見よ。

5．プライマー結合部位(PBS)をデザインする。出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のDNAプライマーを同定する。DNAプライマーの3'端はニック部位のちょうど上流のヌクレオチドである(すなわち、Sp Cas9ではNGG PAMの5'の第4の塩基)。PE2およびPE3への使用のための一般的なデザイン原理として、DNAプライマーに対する12～13ヌクレオチドの相補性を含有するPEgRNAプライマー結合部位(PBS)が、～40-60％GC含量を含有する配列に用いられ得る。低いGC含量を有する配列では、より長い(14～15nt)PBSが試験されるべきである。より高いGC含量を有する配列では、より短い(8～11nt)PBSが試験されるべきである。GC含量にかかわらず、最適なPBS配列は経験的に決定されるはずである。長さpのPBS配列をデザインするためには、出発アレル配列を用いて、PAM含有鎖上のニック部位の5'の最初のpヌクレオチドの逆相補体を取る。図70Eを見よ。

6．RT鋳型(またはDNA合成鋳型)をデザインする。RT鋳型(または、ポリメラーゼが逆転写酵素ではないところでは、DNA合成鋳型)は、デザインされた編集と編集に隣接する配列に対する相同性とをコードする。1つの態様では、これらの領域は図3Dおよび図3EのDNA合成鋳型に対応し、DNA合成鋳型は「編集鋳型」および「相同アーム」を含む。最適なRT鋳型長さは標的部位に基づいて変わる。ショートレンジ編集(位置+1～+6)では、短い(9～12nt)、中程度の(13～16nt)、および長い(17～20nt)RT鋳型を試験することが推奨される。ロングレンジ編集(位置+7以降)では、十分な3'DNAフラップ相同性を許すように、編集の位置から少なくとも5nt(好ましくは10nt以上)伸長するRT鋳型を用いることが推奨される。ロングレンジ編集では、機能的なデザインを同定するために、いくつかのRT鋳型がスクリーニングされるべきである。より大きい挿入および欠失(≧5nt)では、RT鋳型上へのより多大な3'相同性(～20nt以上)の組み込みが推奨される。RT鋳型が、逆転写されるDNA産物上の最後のヌクレオチドとしてのG(PEgRNAのRT鋳型上のCに対応する)の合成をコードするときには、編集効率は典型的には損なわれる。多くのRT鋳型が効率的なプライム編集を支持するので、RT鋳型をデザインするときには、最後の合成されるヌクレオチドとしてのGの回避が推奨される。長さrのRT鋳型配列をデザインするためには、所望のアレル配列を用い、PAMを元々含有した鎖上のニック部位の3'の最初のrヌクレオチドの逆相補体を取る。SNP編集と比較して、同じ長さのRT鋳型を用いる挿入または欠失編集は同一の相同性を含有しないであろうということに注意せよ。図70Fを見よ。

7．完全なPEgRNA配列をアセンブリする。PEgRNA構成要素を次の順序(5'→3')でコンカテネーションする:スペーサー、骨格、RT鋳型、およびPBS。図70Gを見よ。

8．PE3のためのニッキングsgRNAをデザインする。編集の上流および下流の非編集鎖上のPAMを同定する。最適なニッキング位置は高度に遺伝子座依存的であり、経験的に決定されるはずである。一般的に、PEgRNAによって誘導されるニックの向かいの位置の40～90ヌクレオチド5'に置かれたニックは、より高い編集収量およびより少数のインデルに至る。ニッキングsgRNAは、出発アレル上の20ntプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有する。プロトスペーサーがGで始まらない場合には5'Gの追加を有する。図70Hを見よ。

９．ＰＥ３ｂニッキングｓｇＲＮＡをデザインする。ＰＡＭが相補鎖に存在し、その対応するプロトスペーサーが編集のために標的化される配列とオーバーラップする場合には、この編集はＰＥ３ｂシステムの候補であり得る。ＰＥ３ｂシステムでは、ニッキングｓｇＲＮＡのスペーサー配列は出発アレルではなく所望の編集されたアレルの配列にマッチする。編集されるヌクレオチド(単数または複数)がニッキングｓｇＲＮＡプロトスペーサーのシード領域(ＰＡＭに隣接する～１０ｎｔ)内に収まるときには、ＰＥ３ｂシステムは効率的に作動する。これは、編集された鎖の組み入れ後まで相補鎖のニッキングを防止し、標的ＤＮＡに結合することについてのＰＥｇＲＮＡおよびｓｇＲＮＡの間の競合を防止する。ＰＥ３ｂは、両鎖上の同時のニックの生成をもまた回避し、それゆえに、高い編集効率を維持しながらインデル形成を有意に縮減する。ＰＥ３ｂ ｓｇＲＮＡは所望のアレルの２０ｎｔプロトスペーサーにマッチするスペーサー配列を有するべきである。必要とされる場合には５'Ｇの追加を有する。図７０Ｉを見よ。

【０９６７】

好適なＰＥｇＲＮＡおよび第２部位ニッキングｓｇＲＮＡをデザインするための上のステップバイステップのプロセスは、決して限定することを意味されない。本開示は上に記載されているステップバイステップのプロセスのバリエーションを企図し、これらは当業者によって次いで導出可能であろう。

【０９６８】

ひとたび好適なＰＥｇＲＮＡおよびＰＥ融合タンパク質が選択/デザインされると、それらは、好適な方法論によって、例えば、ベクターに基づくトランスフェクション(これにおいては、ベクターによるトランスフェクションによって細胞内で発現される、ＰＥｇＲＮＡおよびＰＥ融合タンパク質をコードするＤＮＡを含む１以上のベクター)、送達フォーマット(例えば、脂質粒子、ナノ粒子)でＰＥｇＲＮＡと複合体化したＰＥ融合タンパク質の直接的送達(例えばＲＮＰ送達)によって、またはｍＲＮＡに基づく送達システムによって、投与され得る。かかる方法は本願において本開示によって記載され、いずれかの公知の方法が利用され得る。

【０９６９】

目当ての標的ＤＮＡに接触することによって、所望の編集がそれに組み入れされるようになるようにして、ＰＥｇＲＮＡおよびＰＥ融合タンパク質(または一緒にＰＥ複合体と言われる)は治療学的有効量で細胞に送達され得る。

【０９７０】

適当な細胞への送達が実現可能である限りは、いずれかの疾患は、着想上はかかる方法によって処置可能である。当業者は、意図される目的および意図される標的細胞に適するようにＰＥ送達方法論を選ぶおよび/またはセレクションする能力があるであろう。

【０９７１】

例えば、いくつかの態様において、かかる疾患(例として、上に記載のとおりの点突然変異に関連するがん)を有する対象へ、有効量の、本明細書に記載の多重フラッププライム編集システム(所望の遺伝子変化を含むドナーＤＮＡ分子の存在下での相同特異的(ｈｏｍｏｌｏｇｙ-ｄｉｒｅｃｔｅｄ)修復によって媒介されるとおりに、点突然変異を修正するかまたは疾患関連遺伝子中へ不活性化突然変異を導入する)を投与することを含む方法が提供される。いくつかの態様において、かかる疾患(例として、上に記載のとおりの点突然変異に関連するがん)を有する対象へ、有効量の、本明細書に記載の多重フラッププライム編集システム(点突然変異を修正するかまたは疾患関連遺伝子中へ不活性化突然変異を導入する)を投与することを含む方法が提供される。いくつかの態様において、疾患は、増殖性疾患である。いくつかの態様において、疾患は、遺伝的疾患である。いくつかの態様において、疾患は、新生物疾患である。いくつかの態様において、疾患は、代謝疾患である。いくつかの態様において、疾患は、リソソーム蓄積症である。点突然変異を修正するかまたは疾患関連遺伝子中へ不活性化突然変異を導入することによって処置され得る他の疾患は当業者に知られており、本開示はこの点において限定されない。

【０９７２】

本開示は、追加の疾患または障害(例として、TPRT媒介の遺伝子編集によって修正され得る点突然変異に関連するかもしくはこれによって引き起こされる疾患または障害)の処置のための方法を提供する。いくつかのかかる疾患は本明細書に記載されており、本明細書に提供されるストラテジーおよび融合タンパク質で処置され得る追加の好適な疾患は本開示に基づき当業者に明らかであろう。例示の好適な疾患および障害は下に列挙される。夫々の配列における特定の位置または残基のナンバリングが、使用される具体的なタンパク質およびナンバリングスキームに依存することは、理解されるであろう。ナンバリングは、例として、成熟したタンパク質の前駆体および成熟したタンパク質それ自体において異なることもあり、種ごと(from species to species)の配列の差異はナンバリングに影響を及ぼすこともある。当業者は、当該技術分野において周知である方法によって(例として、配列の整列および相同の残基の決定によって)、いずれの相同のタンパク質および夫々のコード核酸における夫々の残基を同定することができるであろう。例示の好適な疾患および障害は、限定せずに以下を包含する:2-メチル-3-ヒドロキシ酪酸尿症;3ベータ-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ欠損症;3-メチルグルタコン酸尿症;3-オキソ-5アルファ-ステロイドデルタ4-デヒドロゲナーゼ欠損症;46,XY性転換、1型,3型および5型;5-オキソプロリナーゼ欠損症;6-ピルボイル-テトラヒドロプテリンシンターゼ欠損症;アースコグ症候群;アーセ症候群;2型軟骨無発生症;色覚異常2および7;後天性QT延長症候群;シンゲル(Schinzel)型先端脳梁症候群;先端大腿骨頭異形成症;ホルモン耐性の有無に関わらない先端骨形成不全症2;先端紅斑角皮症(Acroerythrokeratoderma);先端短肢異形成症;Acth-非依存性の副腎皮質大結節性過形成2;活性化PI3K-delta症候群;急性間欠性ポルフィリン症;アシル-CoAデヒドロゲナーゼファミリー、メンバー9の欠損症;アダムス-オリバー症候群5および6;アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症;アデニル酸キナーゼ欠損症;アデニロコハク酸リアーゼ欠損症に起因する溶血性貧血;青年期のネフロン癆;腎・肝・膵異形成症;7型メッケル症候群;副腎白質ジストロフィー;成人接合部型表皮水疱症;表皮水疱症、接合部型、限局性バリアント;成人神経セロイドリポフスチン症;成人神経セロイドリポフスチン症;成人発症の、眼球運動失効を伴う運動失調症;ADULT症候群;無フィブリノーゲン血症および先天性無フィブリノーゲン血症;常染色体潜性無ガンマグロブリン血症2;加齢性黄斑変性症3,6,11および12;アイカルディ・グティエール症候群1,4および5;凍傷状狼瘡1;アラジール症候群1および2;アレキサンダー病;アルカプトン尿症;アラン・ハーンドン・ダドリー症候群;先天性の汎発性脱毛症;アルパース脳症;アルファ-1-抗トリプシン欠損症;常染色体優性の、常染色体劣性の、およびX連鎖劣性のアルポート症候群;アルツハイマー病、家族性、3、痙性対麻痺および運動失行あり;アルツハイマー病、1型,3型および4型;低石灰化型および低成熟型、IIA1遺伝性エナメル質形成不全症;アミノアシラーゼ1欠損症;アーミッシュ小児てんかん症候群;アミロイド形成性トランスサイレチンアミロイドーシス;トランスサイレチンに関する、アミロイド心筋症;心筋症;筋萎縮性側索硬化症1型,6型,15型(前頭側頭型認知症の有無に関わらない),22型(前頭側頭型認知症の有無に関わらない),および10型;TARDBPに関する、TDP43封入体を伴う前頭側頭型認知症;アンダーマン(Andermann)症候群;アンダーセン・タウィル症候群;先天性QT延長症候群;G6PD欠損症に起因する非球形溶血性の貧血症;アンジェルマン(Angelman)症候群;小頭症を伴う、新生児発症の重症脳症;自閉症、X連鎖性3に対する感受性;腎症、動脈瘤、および筋痙攣を伴う遺伝性の血管症;アンジオテンシンi変換酵素、穏やかな血清増加;無虹彩症、小脳性運動失調症、および精神遅滞;無爪症;アンチトロンビンIII欠損症;性器奇形およびステロイド産生異常を伴うアントレー・ビクスラー症候群;家族性胸部大動脈瘤4,6および9;胸部大動脈瘤および大動脈解離;多臓器平滑筋機能障害症候群(multisystemic smooth muscle dysfunction syndrome);もやもや病5;再生不良性貧血;見かけの鉱質コルチコイド過剰;アルギナーゼ欠損症;アルギニノコハク酸リアーゼ欠損症;アロマターゼ欠損症;5型,8型および10型不整脈原性右室心筋症;原発性家族性肥大型心筋症;先天性多発性関節拘縮症、末梢の、X連鎖性;関節拘縮-腎機能障害-胆汁うっ滞症候群;関節拘縮、腎機能障害、および胆汁うっ滞2;アスパラギン合成酵素欠損症;神経細胞移動の異常性;ビタミンE欠損症を伴う運動失調症;感覚

性の、常染色体優性の、運動失調症;運動失調症-毛細血管拡張症候群;遺伝性がん素因症候群(hereditary cancer-predisposing syndrome);無トランスフェリン血症;家族性の心房細動11,12,13および16;心房中隔欠損症2,4および7(心室伝導欠陥の有無に関わらない);心房停止2;房室中隔欠損症4;遺伝性眼球萎縮;ATR-X症候群;耳介下顎骨症候群2;自己免疫疾患、多臓器、小児発症;1a型自己免疫リンパ増殖性症候群;常染色体優性の無汗性外胚葉形成不全症;ミトコンドリアDNA欠失1および3を伴う、常染色体優性の進行性外眼筋麻痺;常染色体優性の捻転ジストニア4;常染色体劣性の中心核ミオパチー;常染色体劣性の先天性魚鱗癬1,2,3,4Aおよび4B;常染色体劣性のIA型および1B型皮膚弛緩症;常染色体劣性の無汗性外胚葉形成不全症候群;外胚葉異形成症11b;発汗低下/毛髪/歯型、常染色体劣性;常染色体劣性低リン酸血症性の骨疾患;3型アクセンフェルト・リーガー症候群;ベインブリッジ・ロパーズ症候群;バナヤン・ライリー・ルバルカ症候群;PTEN過誤腫症候群;バライスター(Baraitser)・ウインター症候群1および2;バラカート症候群;バルデ・ビードル症候群1,11,16および19;2型裸リンパ球症候群、相補群E;出生前2型バーター症候群;バーター症候群の3型,低カルシウム尿を伴う3型,および4型;特発性基底核石灰化症4;連珠毛;良性家族性血尿;良性家族性新生児発作1および2;発作、良性家族性新生児1、および/またはミオキミア;発作、早期小児てんかん性脳症7;良性家族性新生児-小児発作;良性遺伝性舞踏病;心筋症を伴う良性肩甲骨骨膜筋ジストロフィー;A1型およびA2型(常染色体優性)ベルナール・スーリエ症候群;ベストロフィノパチー(常染色体劣性);ベータ サラセミア;ベスレムミオパチーおよびベスレムミオパチー2;ビエッティ結晶性角膜網膜ジストロフィー;胆汁酸合成欠損症、先天性2;ビオチニダーゼ欠損症;バーク・バレル(Birk Barel)精神遅滞異形症候群;眼裂縮小、眼瞼下垂症、および眼瞼内反症;ブルーム症候群;ベルエソン・フォルスマン・レーマン症候群;バウチャー・ノイハウザー(Boucher Neuhauser)症候群;A1型およびA2型乳頭症;高血圧症を伴う乳頭症;出血を伴う脳小血管疾患;分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼキナーゼ欠損症;分岐鎖症候群2および3;乳がん、早期発症;乳房卵巣がん、家族性1,2および4;角膜脆性症候群2;ブロディミオパチー;汗の塩化物上昇の有無に関わらない気管支拡張症3;ブラウン・ビアレット・ヴァン レアレ症候群およびブラウン・ビアレット・ヴァン レアレ症候群2;ブルガダ症候群;ブルガダ症候群1;心室細動;発作性家族性心室細動;ブルガダ症候群およびブルガダ症候群4;QT延長症候群;心臓性突然死;標的(Bull eye)黄斑ジストロフィー;スターガート病4;錐体桿体ジストロフィー12;水疱性魚鱗癬様紅皮症;バーン・マッキューン(Burn-Mckeown)症候群;家族性カンジダ症2,5,6および8;I型およびII型糖タンパク質糖鎖不全症候群;高アンモニア血症に起因する炭酸脱水酵素VA欠損症;結腸癌;心筋不整脈;QT延長症候群、LQT1亜型;チトクロームcオキシダーゼ欠損症に起因する致死性乳児心臓脳筋症;心筋症;ダノン病;肥大型心筋症;左心室非圧縮心筋症;カルネヴァーレ症候群;1型カーニー複合体;カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ欠損症;カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼI,II,II(遅発性)およびII(小児性)欠損症;白内障1,4、常染色体優性、常染色体優性の多型、微小角膜を伴う、コポック様、若年性、微小角膜と糖尿を伴う、および核びまん性非進行性;カテコラミン作動性多形心室頻拍;尾状回帰症候群;家族性Cd8欠損症;中心核疾患;1,9および16番染色体の中心核不安定性ならびに免疫不全;進行性外眼筋を伴う小児小脳性運動失調症および小脳性運動失調症、精神遅滞、ならびに平衡障害症候群2;APPに関する脳アミロイド血管症;大脳皮質下梗塞および白質脳症を伴う、脳の常染色体優性および劣性の動脈症;脳海綿状奇形2;脳・眼・顔・骨格症候群2;脳-眼-顔-骨格症候群;石灰化および嚢胞を伴う脳網膜微小血管症;セロイドリポフスチン症神経細胞2,6,7および10;Ch＼xc3＼xa9diak・東症候群;成人型チェディアック・東症候群;シャルコー・マリー・トゥース病の1B型,2B2型,2C型,2F型,2I型,2U型(軸索性),1C型(脱髄性),優性中間C型,劣性中間A型,2A2型,4C型,4D型,4H型,IF型,IVF型およびX型;肩甲骨腹側脊髄筋萎縮症;遠位型脊髄性筋萎縮症、先天性非進行性;脊髄筋萎縮症、遠位型、常染色体劣性、5;CHARGE関連;小児低リン酸塩症;成人低リン酸塩症;胆嚢炎;進行性家族性肝内胆汁うっ滞3;妊娠性肝内胆汁うっ滞3;コレスタノール蓄積症;コレステロールモノオキシゲナーゼ(側鎖切断)欠損症;ブロムストランド型軟骨異形成症;穿刺性軟骨異形成症1、X連

鎖劣性および2 X連鎖優性;CHOPS症候群;慢性肉芽腫性疾患、常染色体劣性チトクロームb陽性、1型および2型;チュドリー・マッカラー症候群; 原発性毛様体ジスキネジア、7,11,15,20および22;I型シトルリン血症;I型およびII型シトルリン血症;頭蓋骨裂傷症;C様症候群;A型コケイン症候群;原発性補酵素Q10欠乏症、1,4および7;コフィン・シリス/知的障害;コフィン・ローリー症候群;コーエン症候群;寒冷時発汗症候群1;コール・カーペンター症候群2;肉芽腫を伴う、細胞性および体液性免疫複合欠損症;d-2-およびl-2-ヒドロキシグルタル酸複合尿症;マロン酸およびメチルマロン酸複合尿症;酸化的リン酸化複合欠損症1,3,4,12,15および25;一部および全部の17-アルファ-ヒドロキシラーゼ/17,20-リアーゼ複合欠損症;共通可変性免疫不全症9;c1インヒビターの機能不全に起因する補体成分4の部分欠損;補体因子B欠損症;錐体単色症;錐体桿体ジストロフィー2および6; 錐体桿体ジストロフィー遺伝性エナメル質形成不全症;先天性副腎過形成および先天性副腎低形成、X連鎖性;先天性無巨核球性血小板減少症;先天性無虹彩症;先天性中枢性低換気;ヒルシュスプルング病3;先天性収縮性腕十二指腸症;四肢および顔面の先天性拘縮、低緊張、および発育遅延;グリコシル化の先天性障害1B型,1D型,1G型,1H型,1J型,1K型,1N型,1P型,2C型,2J型,2K型,IIm型;I型およびII型先天性赤血球異形成貧血;顔面の先天性外胚葉異形成症;先天性赤血球生成性ポルフィリン症;2型先天性全身性リポジストロフィー;先天性心疾患、多発型2;先天性心疾患;大動脈弓離断症;先天性脂肪腫性過成長、血管奇形、および表皮母斑;非小細胞肺がん;卵巣の新生物;心伝導系障害、非特異性;先天性微絨毛萎縮症;先天性筋ジストロフィー;LAMA2の部分的欠損に起因する先天性筋ジストロフィー;先天性筋ジストロフィー－脳および眼の異常を伴うジストログリカノパチー、A2型,A7型,A8型,A11型およびA14型;先天性筋ジストロフィー－精神遅滞を伴うジストログリカノパチー、B2型,B3型,B5型およびB15型;先天性筋ジストロフィー－精神遅滞を伴わないジストログリカノパチー、B5型;先天性筋肥大－大脳症候群;先天性筋無力症候群、アセタゾールアミド反応性;繊維型不均衡を伴う先天性ミオパチー;先天性眼球コロボマ;先天性静止型夜盲症、1A型,1B型,1C型,1E型,1F型および2A型;コプロポルフィリン症;角膜平板症2;角膜ジストロフィー、フックス内皮性4;2型角膜内皮性ジストロフィー;角膜脆弱性ケラトグロブ、青色強膜、および関節過度可動性;コーネリア ド ランゲ症候群1および5;常染色体優性の冠動脈疾患2;冠状動脈疾患;高αリポタンパク質血症2; 皮質異形成症(他の脳奇形との複合)5および6;後頭部の皮質奇形;コルチコステロイド結合グロブリン欠損症;2型コルチコステロンメチルオキシダーゼ欠損症;コステロ症候群;カウデン症候群1;扁平股;常染色体優性の頭蓋骨異形成症;頭蓋縫合早期癒合症1および4;頭蓋縫合早期癒合症および歯異常;クレアチン欠損症、X連鎖;クルーゾン症候群;潜在眼球症候群;停留精巣、片側または両側;クッシング指節癒合症;皮膚悪性黒色腫1;骨異栄養症と、肺、胃腸、および泌尿器の重度の異常とを伴う皮膚弛緩症;チアノーゼ、一過的な新生児のおよび非定型の腎症;嚢胞性線維症;シスチン尿症;シトクロムcオキシダーゼi欠損症;シトクロムcオキシダーゼ欠損症;D-2-ヒドロキシグルタル酸尿症2;分節性ダリエー病;内耳形成不全、小耳症、および小歯症(LAMM)を伴う難聴;難聴、常染色体優性3a,4,12,13,15、常染色体優性の非症候性感音性17,20および65;難聴、常染色体劣性1A,2,3,6,8,9,12,15,16,18b,22,28,31,44,49,63,77,86および89;難聴、蝸牛の、近視および知的障害あり、前庭障害なし、常染色体優性、X連鎖2;2-メチルブチリル-CoA脱水素酵素の欠損症;3-ヒドロキシアシル-CoA脱水素酵素の欠損症;アルファ-マンノシダーゼの欠損症;芳香族-L-アミノ酸脱炭酸酵素の欠損症;ビスホスホグリセリン酸ムターゼの欠損症;ブチリル-CoA脱水素酵素の欠損症;フェロキシダーゼの欠損症;ガラクトキナーゼの欠損症;グアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼの欠損症;ヒアルロノグルコサミニダーゼの欠損症;リボース-5-リン酸イソメラーゼの欠損症;ステロイド11-ベータ-モノオキシゲナーゼの欠損症;UDPグルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼの欠損症;キサンチンオキシダーゼの欠損症;デジェリン・ソッタス病;シャルコー・マリー・トゥース病、ID型およびIVF型;デジェリン・ソッタス症候群、常染色体優性;樹状細胞、単球、Bリンパ球、およびナチュラルキラーリンパ球の欠損症;デビュクワ(Desbuquois)異形成症2; デビュクワ症候群;DFNA 2非症候性の聴力低下;視神経萎縮およ

び難聴を伴う糖尿病および尿崩症;2型糖尿病、およびインスリン依存性20;ダイアモンド・ブラックファン貧血1,5,8および10;下痢3(分泌性ナトリウム、先天性、症候性)、および5(タフティング腸症(tufting enteropathy)を伴う、先天性);ジカルボキシルアミノ酸尿症;びまん性掌蹠角化症、ボスニア型;デジトレノ脳症候群;ジヒドロプテリジン還元酵素欠損症;拡張型心筋症1A,1AA,1C,1G,1BB,1DD,1FF,1HH,1I,1KK,1N,1S,1Yおよび3B;左心室非圧縮3;シトクロムp450酸化還元酵素欠損症に起因するステロイド産生異常;遠位型関節拘縮2B型;遠位型遺伝性運動ニューロン症2B型;遠位型ミオパチーMarkesbery-Griggs型;遠位型脊髄性筋萎縮症、X連鎖3;二重睫毛・リンパ浮腫症候群;皮膚の欠如を伴う、優性栄養傷害性表皮水疱症;優性遺伝性視神経萎縮症;ドンナイ・バロウ症候群;ドーパミン ベータ水酸化酵素欠損症;ドーパミン受容体d2、脳内密度低下;ダウリング・デゴス病4;ドイン蜂巣状網膜ジストロフィー;マラティア・レベンチーヌ(Malattia leventinese);2型デュアン症候群;デュビン・ジョンソン症候群;デュシェンヌ型筋ジストロフィー;ベッカー型筋ジストロフィー;異常フィブリノーゲン血症;常染色体優性の先天性角化異常症および常染色体優性、3;常染色体劣性の先天性角化異常症1,3,4および5;X連鎖性の先天性角化異常症;顔面ミオキミアを伴う、家族性ジスキネジア;プラスミノーゲン分子異常症;ジストニア2(捻転、常染色体劣性),3(捻転、X連鎖),5(ドーパ反応型),10,12,16,25,26(ミオクロニー);良性家族性乳児の発作2;早期乳児てんかん性脳症2,4,7,9,10,11,13および14;非定型レット症候群;初期T細胞前駆体急性リンパ性白血病;外胚葉性異形成表皮水疱症候群;外胚葉性異形成-合指症候群1;偏位水晶体、単独で(isolated)常染色体劣性および優性;裂手裂足(Ectrodactyly)、外胚葉性異形成、および口唇口蓋裂症候群3;エーラス・ダンロス症候群7型(常染色体劣性)、古典型、2型(早老性)、ヒドロキシリジン欠損型、4型、4型バリアント、およびテナシンX欠損に起因するもの;アイヒスフェルト型先天性筋ジストロフィー;内分泌-大脳骨異形成症(cerebroosteodysplasia);S錐体増強症候群;拡大前庭水管症候群;エンテロキナーゼ欠損症;疣贅状表皮発育異常症;単純型表皮水疱症および肢帯筋ジストロフィー、斑状色素沈着(mottled pigmentation)を伴う単純型、幽門閉鎖を伴う単純型、単純型、常染色体劣性、および幽門閉鎖を伴う;表皮剥離性掌蹠角化症;家族性熱性痙攣8;てんかん、小児欠神2,12(特発性全身、感受性),5(夜間前頭葉型)、夜間前頭葉型1、部分性、可変の病巣があるもの(with variable foci)、進行性ミオクロニー3、およびX連鎖性、可変の学習障害および行動障害があるもの;てんかん性脳症、小児期発症、乳児期早期、1,19,23,25,30および32;骨端異形成症、多発性、近視および伝音難聴を伴う;一過性運動失調症2型;一過性疼痛症候群、家族性、3;エプスタイン症候群;フェクトナー症候群;赤芽球増殖性プロトポルフィリン症;エストロゲン抵抗性;滲出性硝子体網膜症6;ファブリー病、およびファブリー病、心臓変異型;第H因子、第VII因子、第X因子、第v因子、および第viii因子の、2つの複合欠損症、第xiii因子、サブユニット、欠損症;家族性腺腫性ポリポーシス1および3;蕁麻疹および難聴を伴う家族性アミロイド腎症;家族性寒冷蕁麻疹;家族性の小脳虫部無発生;家族性良性天疱瘡;家族性乳がん;乳がん感受性(Breast cancer, susceptibility to);骨肉腫;膵臓がん3;家族性心筋症;家族性寒冷自己炎症性症候群2;家族性大腸がん;家族性滲出性硝子体網膜症、X連鎖性;家族性片麻痺性片頭痛1型および2型;家族性高コレステロール血症;家族性肥大型心筋症1,2,3,4,7,10,23および24;家族性低カリウム血症-低マグネシウム血症;家族性低形成の、糸球体嚢胞腎;家族性乳児筋無力症;家族性若年性痛風;家族性地中海熱、および家族性地中海熱、常染色体優性;家族性多弁症;家族性晩発性皮膚ポルフィリン症;家族性肺毛細血管腫症;家族性腎性糖尿;家族性腎性低尿酸血症;家族性拘束性心筋症1;家族性1型および3型高リポ蛋白血症;ファンコニー貧血，補欠群E,I,NおよびO;ファンコニー・ビッケル症候群;ファビズム感受性(Favism, susceptibility to);熱性痙攣、家族性、11;フェインゴールド症候群1;胎児ヘモグロビン量的形質遺伝子座1;FG症候群およびFG症候群4;眼球外筋の線維症、先天性、1,2,3a(眼球外病変の有無に関わらない),3b;魚眼病;フレック角膜ジストロフィー;フローティング・ハーバー症候群;精神遅滞の有無に関わらない、言語障害を伴う焦点てんかん;巣状分節性糸球体硬化症5;前脳欠損症;フランク・テル・ハール症候群;Borrone Di Rocco Crovato症候群;フレイジャー

症候群;ウィルムス腫瘍1;フリーマン・シェルドン症候群;前頭骨幹端異形成症1および3;前頭側頭型認知症;前頭側頭型認知症および/または筋萎縮性側索硬化症3および4;前頭側頭型認知症第3染色体連鎖性および前頭側頭型認知症ユビキチン陽性;フルクトース-ビホスファターゼ欠損症;フールマン(Fuhrmann)症候群;ガンマ-アミノ酪酸トランスアミナーゼ欠損症;ガムストープ・ウォールファールト(Gamstorp-Wohlfart)症候群; ゴーシェ病1型および亜急性神経障害性;進行性の脊椎側弯症を伴う、家族性水平注視麻痺;全般性優性ジストロフィー型表皮水疱症;全般性てんかん、熱性痙攣プラス3,1型,2型を伴う;レノックス・ガストー型てんかん脳症;巨大軸索ニューロパチー;グランツマン血栓症;緑内障1、開放角、e,FおよびG;緑内障3、原発性先天性、d;先天性緑内障、および先天性緑内障、コロボマ;緑内障、原発性開放角、若年性発症;神経膠腫感受性1;グルコーストランスポーター1型欠損症候群;ルコース-6-リン酸輸送欠損症;GLUT1欠損症候群2;特発性全般性てんかん感受性、12;グルタミン酸ホルミノトランスフェラーゼ欠損症;グルタル酸血症IIAおよびIIB;グルタル酸尿症1型;グルタチオン合成酵素欠損症;糖原病0(筋肉),II(成人形),IXa2,IXc,1A型;II型,IV型,IV(肝とミオパチーとの複合),V型およびVI型;ゴールドマン・ファーブル症候群;ゴードン症候群;ゴーリン症候群;全前脳胞症シークエンス;全前脳胞症7;顆粒腫性疾患、慢性、X連鎖性、バリアント;卵巣の顆粒膜細胞腫瘍;灰色血小板症候群;グリセリ症候群3型;グレーノー角膜ジストロフィーI型;成長および精神遅滞、下顎顔面異形症、小頭症、および口蓋裂;下垂体異常を伴う成長ホルモン欠損症;免疫不全を伴う成長ホルモン不感受性;GTPシクロハイドロラーゼI欠損症;ハジュ・チーニー症候群;手足子宮症候群;聴覚障害;小児毛細血管腫;血液腫瘍;ヘモクロマトーシス1型,2B型および3型;糖尿病の微小血管合併症7;トランスフェリン血清レベル量的形質座2;ヘモグロビンH病、無欠損;グルコースリン酸イソメラーゼ欠損症に起因する、溶血性貧血、非球状赤血球性;血球貪食性リンパ組織球症、家族性、2;血球貪食性リンパ組織球症、家族性、3;ヘパリン補因子II欠損症;遺伝性腸性先端皮膚炎;遺伝性乳がん・卵巣がん症候群;運動失調・毛細血管拡張症様障害;遺伝性びまん性胃がん;スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症;遺伝性第II,第IX,第VIII因子欠損症;遺伝性出血性毛細血管拡張症2型;無汗症を伴う遺伝性無痛症;遺伝性リンパ浮腫I型;視神経萎縮を伴う遺伝性運動・感覚神経症;早期呼吸不全を伴う遺伝性ミオパチー;遺伝性神経痛性筋萎縮症;遺伝性非ポリポーシス大腸新生物;リンチ症候群IおよびII;遺伝性膵炎;慢性膵炎感受性;遺伝性感覚・自律神経障害IIB型およびIIA型;遺伝性鉄芽球性貧血;ヘルマンスキー・ポドラック症候群1,3,4および6;内臓錯位、2,4および6、常染色体;内臓錯位、X連鎖性;組織球性髄様細網症;異所形成;組織球症-リンパ節腫大プラス症候群;ホロカルボキシラーゼ合成酵素欠損症;全前脳胞症2,3,7および9;ホルト・オラム症候群;MTHFR欠損症、CBS欠損症、およびホモシステイン尿症に起因するホモシステイン血症、ピリドキシン応答性;コバラミン代謝異常に起因する、ホモシステイン尿症-巨赤芽球性貧血、cblE相補型;ハウエル・エバンス(Howel-Evans)症候群;ハーラー症候群;ハッチンソン・ギルフォード症候群;水頭症;高アンモニア血症、III型;高コレステロール血症、および高コレステロール血症、常染色体劣性;過剰驚愕症2および遺伝性の過剰驚愕症;高フェリチン血症白内障症候群;高グリシン尿症;周期性発熱を伴う高免疫グロブリンD;メバロン酸尿症;高免疫グロブリンE症候群;家族性の高インスリン血症性低血糖症3,4および5;高インスリン血症-高アンモニア血症症候群;高リシン血症;ジストニア、赤血球増加症、および肝硬変を伴う高マンガン血症;高オルニチン血症-高アンモニア血症-ホモシトルリン尿症症候群;副甲状腺機能亢進症1および2;副甲状腺機能亢進症、新生児重度;部分的pts欠損症、BH4欠損症、D、非pkuに起因する、高フェニルアラニン血症、bh4欠損症、a;精神遅滞症候群2,3および4を伴う高リン酸血症;多毛性骨軟骨異形成症;apob32に関連する、低ベータリポ蛋白血症、家族性;低カルシウム血症、常染色体優性1;低カルシウム尿性高カルシウム血症、家族性、1型および3型;低軟骨形成症;鉄過剰症を伴う低クロム小球性貧血;肝臓中グリコーゲン合成酵素の欠損症を伴う低血糖症;臭覚障害の有無に関わらない低ゴナドトロピン性性腺機能低下症11;免疫不全を伴う無汗性外胚葉形成不全症;発汗低下のX連鎖性外胚葉異形成;低カリウム性周期性四肢麻痺1および2;低マグネシウム血症1、腸の;低マグネシウム血症、発作

、および精神遅滞;低髄性白質ジストロフィー7;左心低形成症候群;房室中隔欠損症および共通房室接合部;尿道下裂1および2、X連鎖性;甲状腺機能低下症、先天性非甲状腺腫、1;減毛症8および12;減毛症-リンパ浮腫-血管拡張症候群;I血液型系;シーメンス型水疱性魚鱗癬;剥脱性魚鱗癬;未熟児魚鱗癬症候群;特発性基底核石灰化症5;特発性線維性肺胞炎、慢性型;先天性角化不全症、常染色体優性、2および5;乳児期の特発性高カルシウム血症;カルシウム流入障害2に起因するT細胞不活性化を伴う免疫機能障害; 1型および2型高IgMを伴う、cd3-ゼータの欠陥に起因する、免疫不全15,16,19,30,31C,38,40,8、ならびにマグネシウム欠陥を伴う、X連鎖性、エプスタイン・バーウイルス感染、および新形成;免疫不全-動原体不安定性-顔面奇形症候群2;封入体ミオパチー2および3;野中ミオパチー;乳児痙攣および発作性舞踏症、家族性;乳児皮質過骨症;乳児GM1ガングリオシドーシス;乳児低ホスファタシアーゼ血症;乳児ネフロン癆;乳児眼振、X連鎖性;乳児パーキンソン病-ジストニア;多尾性精子および過剰なDNAに関連する不妊症;インスリン抵抗性;インスリン抵抗性糖尿病および黒色表皮腫;インスリン依存性糖尿病分泌性下痢症候群;間質性腎炎、核巨大化(karyomegalic);子宮内発育遅延、骨幹端異形成症、先天性副腎低形成、および性器奇形;ヨードチロシン結合欠損症;IRAK4欠損症;虹彩隅角異発生優性型および1型;脳内鉄蓄積;坐骨膝蓋骨異形成;膵島細胞過形成;17,20-リアーゼ単独欠損症;ルトロピン単独欠損症;イソバレリル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症;ヤンコヴィッチ・リベラ症候群;ジャーベルおよびランゲ・ニールセン症候群2;ジュベール症候群1,6,7,9/15(2遺伝子性),14,16および17、ならびに口顔面指症候群xiv;ヘルリッツの接合部表皮水疱症;若年性GM＞1＜ガングリオシドーシス;若年性ポリポーシス症候群;若年性ポリポーシス/遺伝性出血性毛細血管拡張症症候群;若年性網膜炎;歌舞伎メーキャップ症候群;カルマン症候群1,2および6;思春期遅延症;神崎病;カラック症候群;カルタゲナー症候群;ケニー・ケイフィ症候群2型;ケッペン・ルビンスキー(Keppen-Lubinsky)症候群;円錐角膜1;毛包性角化症;掌蹠膿疱症1;キンドラー症候群;L-2-ヒドロキシグルタル酸尿症;ラーセン症候群、優性型;格子状角膜ジストロフィーIII型;レーバー黒内障;ツェルウェガー症候群;ペルオキシソーム生合成異常症;ツェルウェガー症候群スペクトラム;レーバー先天性黒内障11,12,13,16,4,7および9;レーバー視神経萎縮症;アミノグリコシド誘発性難聴;難聴、非症候性感音性、ミトコンドリア;左心室非圧縮症5;左右軸奇形;リー病;ミトコンドリア短鎖エノイル-CoAヒドラターゼ1欠損症;ミトコンドリア複合体I欠損症に起因するリー症候群;ライナー病;レリー・ワイル軟骨骨異形成症;致死性先天性拘縮症候群6;白血球接着不全症I型およびIII型;白骨ジストロフィー、ミエリン形成不全性、11および6;白質脳症、運動失調を伴う、脳幹・脊髄障害と乳酸値上昇とを伴う、白質の消失を伴う、および進行性の、卵巣不全を伴う;全白爪;レビー小体型認知症;リヒテンシュタイン・クノール症候群;リー・フラウメニ症候群1;Lig4症候群;肢帯筋ジストロフィー1B型,2A型,2B型,2D型,C1型,C5型,C9型,C14型;脳および眼の異常を伴う先天性筋ジストロフィー-ジストログリカノパチー、A14型およびB14型;複合型リパーゼ欠損症;脂肪蛋白症;リポジストロフィー、家族性部分的、2型および3型;脳回欠損1,2(X連鎖性),3,6(小頭症を伴う),X連鎖性;皮質下帯状ヘテロトピア、X連鎖性;急性乳児肝不全;ロイス・ディーツ症候群1,2,3;QT延長症候群1,2,2/9,2/5,(2遺伝子性),3,5および5、後天性、感受性;肺がん;リンパ浮腫、遺伝性、id;リンパ浮腫、原発性、骨髄異形成を伴う;リンパ増殖症候群1,1(X連鎖性)および2;リソソーム酸リパーゼ欠損症;大頭症、巨人症、顔面異形症候群;黄斑変性症、卵黄様、成人期に発症;悪性高熱感受性1型;悪性リンパ腫、非ホジキン;悪性黒色腫;前立腺の悪性腫瘍;下顎骨異形成症;A型またはB型リポジストロフィーを伴う下顎骨異形成症、非定型;下顎顔面異形成症、トレーチャー・コリンズ型、常染色体劣性;マンノース結合タンパク質欠乏症;メープルシロップ尿症1A型および3型;マルデン・ウォーカー様症候群;マルファン症候群;マリネスコ・Sj＼xc3＼xb6gren症候群;マートソフル(Martsolf)症候群;成熟期に発症する若年性糖尿病、1型,2型,11型,3型および9型;メイ・ヘグリン異常症;MYH9関連疾患;セバスチャン症候群;マキュン・オルブライト症候群;体細胞腺腫;性索-間質性腫瘍;クッシング症候群;マクシック・カウフマン症候群;マクラウド神経赤血球症症候群;メッケル・グルーバー症候群;中鎖アシル-補酵素

A脱水素酵素欠損症;髄芽腫;皮質下嚢胞1および2aを伴う大脳白質脳症;大頭-先天性大理石様皮膚;PIK3CA関連過成長スペクトラム;巨脳-多小脳回-多指-水頭症候群2;巨大芽球性貧血、チアミン反応性、糖尿病および感音性難聴を伴う;マイヤー・ゴーリン症候群1および4;メルニック・ニードルズ症候群;髄膜腫;精神遅滞、X連鎖性、3,21,30および72;精神遅滞および小頭症、脳橋および小脳の低形成を伴う;X連鎖精神遅滞症候群5;精神遅滞、上顎前突、および斜視;精神遅滞、常染色体優性12,13,15,24,3,30,4,5,6および9;精神遅滞、常染色体劣性15,44,46および5;精神遅滞、定型動作、てんかん、および/または脳奇形;精神遅滞、症候群性、クラース・ジェンセン(Claes-Jensen)型、X連鎖性;精神遅滞、X連鎖、非特異的、症候性、ヘデラ(Hedera)型、および症候性、ウー(wu)型;メロシン欠損型先天性筋ジストロフィー;異染性白質ジストロフィー若年型、乳児期後期型、および成人型;異染性白質ジストロフィー;変容性骨異形成症;メトヘモグロビン血症I型および2型;メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ欠損症、常染色体優性;ホモシスチン尿症を伴うメチルマロン酸血症;メチルマロン酸尿症cblB型;メチルマロニル-CoAムターゼ欠損症に起因するメチルマロン酸尿症;メチルマロン酸尿症mut(0)型;小頭症性骨異形成原基性小人症2型;絨毛網膜症、リンパ浮腫、または精神遅滞の有無に関わらない小頭症;小頭症、裂孔ヘルニア、およびネフローゼ症候群;小頭症;脳梁の低形成症;痙性対麻痺50、常染色体劣性;全身性発育遅延;CNSミエリン形成不全症;脳萎縮;小頭症、正常な知能および免疫不全;小頭症-毛細血管奇形症候群;小球性貧血;症候群性小眼球症5,7および9;小眼球症、単独3,5,6,8、およびコロボマ6を伴う;微小球症;片頭痛、家族性片麻痺性;ミラー症候群;外眼筋麻痺を伴うミニコアミオパチー;コアを伴う先天性ミオパチー;ミッチェル・ライリー症候群;ミトコンドリア3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA合成酵素欠損症;ミトコンドリア複合体I,II,III,III(核型2,4または8)欠損症;ミトコンドリアDNA枯渇症候群11,12(心筋症型),2,4B(MNGIE型),8B(MNGIE型);ミトコンドリアDNA枯渇症候群3および7,肝脳型および13(脳筋症型);ミトコンドリアリン酸担体およびピルビン酸担体欠損症;ミトコンドリア三機能性タンパク質欠損症;長鎖3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ欠損症;三好型筋ジストロフィー1;遠位型ミオパチー、前脛骨発症を伴う;モーア・トラネジャーグ(Mohr-Tranebjaerg)症候群;モリブデン補因子欠損症、相補群A;モワット・ウィルソン症候群;ムコリピドーシスIIIガンマ;ムコ多糖症VI型,VI型(重症)およびVII型;ムコ多糖症、MPS-I-H/S,MPS-II,MPS-III-A,MPS-III-B,MPS-III-C、MPS-IV-A,MPS-IV-B;網膜色素変性症73;ガングリオシドーシスGM1型1(心臓障害を伴う)3;多中心性骨溶解腎症;多中心性骨溶解、結節症、および関節症;多発性先天異常;心房中隔欠損症2;多発性先天異常-筋緊張低下-発作症候群3;多発性の皮膚および粘膜静脈奇形;多発性内分泌腺新形成1型および4型;多発性骨端異形成症5型または優性;多発性腸管閉鎖症;多発性翼状片症候群エスコバール型;多発性スルファターゼ欠損症;多発性骨癒合症症候群3;筋AMPグアニンオキシダーゼ欠損症;筋眼脳疾患;筋ジストロフィー、先天性、巨円錐体型;筋無力症、家族性小児、1;アセチルコリン受容体欠損症に関連する、先天性筋無力症症候群11;先天性筋無力症症候群17,2A(スローチャネル),4B(ファストチャネル)および管状集合体を伴わない;ミエロペルオキシダーゼ欠損症;MYH関連ポリポーシス;子宮内膜癌;心筋梗塞1;ミオクローヌス性ジストニア;ミオクローヌス性-無緊張性てんかん;赤色ボロ繊維・ミオクローヌスてんかん;筋原線維ミオパチー1およびZASP関連;ミオグロビン尿、急性再発性、常染色体劣性;筋神経胃腸管性脳症症候群;進行性外眼筋麻痺を伴う小児小脳性運動失調症;ミトコンドリアDNA枯渇症候群4B、MNGIE型;ミオパチー、中心核、1、先天性、過剰の筋紡錘を伴う、遠位の、1、乳酸アシドーシス、および鉄芽球性貧血1、先天性白内障を伴うミトコンドリア進行性の、聴覚消失、および発育遅延、および管状集合体、2;近視6;筋硬化症、常染色体劣性;先天性筋強直症;先天性筋強直症、常染色体優性型および劣性型;爪膝蓋骨症候群;ナンス・ホラン症候群;小眼球症2;ナバホ神経肝障害;ネマリンミオパチー3および9;新生児筋緊張低下;知的障害;痙攣;言語発達遅延;精神遅滞、常染色体優性31;シトリン欠損症によって引き起こされる新生児肝内胆汁うっ滞;腎性尿崩症、腎性尿崩症、X連鎖性;腎結石症/骨粗鬆症、低リン酸血症性、2;ネフロン癆13,15および4;不妊症;脳-眼-腎症候群(ネフロン癆、眼球運動失

効、および小脳異常);ネフローゼ症候群、3型,5型、眼球異常の有無に関わらない、7型および9型;ネスター・グレルモプロジェリア症候群;ノイ・ラクソバ(Neu-Laxova)症候群1;脳鉄蓄積を伴う神経変性症4および6;神経フェリチン症;神経線維腫症、1型および2型;神経線維肉腫;神経下垂体性尿崩症;ニューロパチー、遺伝性感覚性、IC型;中性1アミノ酸輸送障害;ミオパチーを伴う中性脂質蓄積症;好中球免疫不全症候群;ニコライデス・バライスター症候群;ニーマン・ピック病C1型,C2型,A型およびC1、成人型;非ケトーシス性高グリシン血症;ヌーナン症候群1および4、LEOPARD症候群1;若年性骨髄単球性白血病の有無に関わらないヌーナン症候群様障害;正常カリウム血性周期性四肢麻痺、カリウム感受性;ノルム病;てんかん、聴覚消失、および精神遅滞症候群;精神遅滞、X連鎖性102および症候性13;肥満;眼白子症、I型;眼皮膚白子症1B型,3型および4型;眼歯指異形成症;歯限局型低ホスファターゼ症;歯-毛髪-四肢症候群(Odontotrichomelic syndrome);大口病;減歯症-大腸直腸癌症候群;オピッツG/BBB症候群;視神経萎縮症9;口腔顔面指趾症候群;オルニチンアミノトランスフェラーゼ欠損症;口腔顔面裂11および7、口唇/口蓋外胚葉異形成症候群;オルスタビック・リンデマン・ソルベルグ症候群;軽度の軟骨異形成症を伴う骨関節炎;離断性骨軟骨炎;骨形成不全症12型,5型,7型,8型,I型,III型、正常な強膜を伴う、優性型、劣性周産期致死性;頭蓋骨硬化症を伴う線条骨症;常染色体優性の大理石骨症1型および2型,劣性4型,劣性1型,劣性6型;偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症;耳口蓋指症候群I型およびII型;卵巣形成不全1;卵巣白質脳症;先天性爪肥厚症4および2型;骨パジェット病、家族性;パリスター・ホール症候群;掌蹠角化症、非表皮剥離性、局所性またはびまん性;膵臓無形成および先天性心疾患;パピロン・Lef＼xc3＼xa8vre症候群;傍神経膠節腫3;フォン・オレインブルグ(von Eulenburg)の先天性異常筋強直症;副甲状腺癌;パーキンソン病14,15,19(若年性発症),2,20(早期発症),6,(常染色体劣性の早期発症)および9;限局性白皮証;ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ部分欠損症;網膜色素上皮の模様ジストロフィー;PC-K6a;ペリザウス・メルツバッハー病;ペンドレッド症候群;末梢性脱髄性神経障害、中枢性脱髄性;ヒルシュスプルング病;永続型新生児糖尿病;永続型新生児糖尿病、神経学的特色を伴う;新生児インスリン依存性糖尿病;若年発症成人型糖尿病、2型;ペルオキシソーム生合成障害14B,2A,4A,5B,6A,7Aおよび7B;ペロー症候群4;ペリー症候群;新生児の持続性高インスリン性低血糖症;家族性高インスリン症;表現型;フェニルケトン尿症;褐色細胞腫;遺伝性パラガングリオーマ-褐色細胞腫症候群;パラガングリオーマ1;腸のカルチノイド腫瘍;カウデン症候群3;ホスホグリセリン酸脱水素酵素欠損症;ホスホグリセリン酸キナーゼ1欠損症;光感受性硫黄欠乏性毛髪発育異常症;フィタン酸蓄積病;ピック病;ピアソン症候群;色素性網膜ジストロフィー;色素性結節状副腎皮質病変、原発性、1;石灰化上皮腫;ピット・ホプキンス症候群;下垂体依存性高コルチゾール症;下垂体ホルモン欠損症、複合型1,2,3および4;プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1型欠損症;プラスミノーゲン欠損症、I型;血小板型出血障害15および8;多形皮膚萎縮症、遺伝性線維化、腱性拘縮、ミオパチー、および肺線維症を伴う;多発性嚢胞腎疾患2、成人型および乳児型;硬化性白質脳症を伴う多嚢胞性脂肪膜性骨異形成症;免疫不全の有無に関わらないポリグルコサン体ミオパチー1;多小脳回、非対称性、両側性前頭頭頂部;多発性神経炎、聴覚消失、運動失調、網膜色素変性、および白内障;4型橋小脳形成不全症;膝窩部贅皮症候群;孔脳症2;汗孔角化症8、伝染性表層化学活性型;ポルフォビリノーゲン合成酵素欠損症;晩発性皮膚ポルフィリン症;網膜色素変性症を伴う脊髄後索性失調症;後極白内障2型;プラダー・ウィリー様症候群;早発卵巣不全4,5,7および9;原発性常染色体劣性小頭症10,2,3および5;原発性線毛機能不全24;原発性拡張型心筋症;左心緻密化障害6;4、左心緻密化障害10;発作性心房細動;原発性高シュウ酸尿症、I型およびIII型;原発性肥大性骨関節症、常染色体劣性2;原発性低マグネシウム血症;原発性開放隅角緑内障若年発症1;原発性肺高血圧症;プリムローズ症候群;進行性家族性心ブロック1B型;進行性家族性肝内胆汁うっ滞2および3;進行性肝内胆汁うっ滞;運動失調症を伴う進行性ミオクローヌスてんかん;進行性偽リウマチ性異形成症;進行性硬化性灰白異栄養症;プロリダーゼ欠損症;プロリン脱水素酵素欠損症;統合失調症4;プロパジン欠損症、X連鎖性;プロピオン酸血症;プロタンパク質変換酵素1/3欠損症;前立腺がん、遺伝性、

2;プロタン欠損症;蛋白尿;フィンランド型先天性ネフローゼ症候群;プロテウス症候群;乳腺癌;偽軟骨発育不全脊椎骨端異形成症;偽性低アルドステロン症1型常染色体優性および劣性および2型;偽性副甲状腺機能低下症1A型;偽性偽性副甲状腺機能低下症;仮性新生児副腎白質ジストロフィー;偽原発性高アルドステロン症;弾性線維性仮性黄色腫;乳児の全身性動脈石灰化症2;多発性凝固因子欠損症を伴う弾性線維性仮性黄色腫様障害;乾癬感受性2;PTEN過誤腫症候群;遺伝性出血性毛細血管拡張症に関連する肺動脈性高血圧症;肺線維症および/または骨髄不全、テロメアに関連する、1および3;遺伝性出血性毛細血管拡張症を伴う、肺高血圧症、原発性、1;プリン-ヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症;ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損症;ピルビン酸脱水素酵素E1-アルファ欠損症;赤血球のピルビン酸キナーゼ欠損症;レイン症候群;ラスオパチー;劣性栄養障害性表皮水疱症;爪障害、非症候性先天性、8;ライフェンスタイン症候群;腎欠損症;腎カルニチン輸送障害;腎コロボマ症候群;腎異形成症;腎異形成症、網膜色素性ジストロフィー、小脳性運動失調症、および骨格異形成症;遅発性感音性聴覚消失を伴うか、または溶血性貧血を伴う、腎尿細管性アシドーシス、遠位型、常染色体劣性;眼球異常および精神遅滞を伴う、腎尿細管性アシドーシス、近位型;網膜錐体ジストロフィー3B;網膜色素変性症;網膜色素変性症10,11,12,14,15,17および19;網膜色素変性症2,20,25,35,36,38,39,4,40,43,45,48,66,7,70,72;網膜芽細胞腫;レット障害;ラブドイド腫瘍素因症候群2;裂孔原生網膜剥離、常染色体優性;肢根型点状軟骨異形成症2型および3型;ロバーツ-SCあざらし肢奇形症候群;ロビノー・ソラウフ(Robinow Sorauf)症候群;ロビノー症候群、常染色体劣性、短合多指症を伴う常染色体劣性;ロスムンド・トムソン症候群;ラパデリノ症候群;RRM2B関連ミトコンドリア病;ルービンシュタイン・タイビ症候群;サラ病;サンドホフ病、成人型および乳児型;サルコイドーシス、早期発症;ブラウ症候群;シンドラー病、1型;裂脳症;統合失調症15;蝸牛様骨盤異形成症;神経鞘腫症2;シュワルツ・ヤンペル症候群1型;角膜硬化、常染色体劣性;硬結性骨化症;二次性甲状腺機能低下症;瀬川症候群、常染色体劣性;セニオール・ローケン症候群4および5;感覚性運動失調型ニューロパチー、構音障害、および眼麻痺;セピアプテリン還元酵素欠損症;SeSAME症候群;小頭症、成長遅延、電離放射線感受性を伴う、ADA欠損症に起因する重症複合免疫不全症、非定型、常染色体劣性、T細胞陰性、B細胞陽性、NK細胞陽性のNK細胞陰性;重症先天性好中球減少症;重症先天性好中球減少症3、常染色体劣性または優性;重症先天性好中球減少症および6、常染色体劣性;乳児期の重篤なミオクロニーてんかん;熱性痙攣プラスの全般てんかん、1型および2型;重篤なX連鎖性筋細管ミオパチー;QT短縮症候群3型;非特異的な骨格異常を伴う低身長;低身長、耳道狭窄症、下顎形成不全、骨格異常;低身長、爪甲形成不全、顔異形、および貧毛症;原基性小人症;多指症の有無に関わらない短肋胸郭異形成症11または3;シアリドーシスI型およびII型;シルバー痙性対麻痺症候群;神経伝導速度遅延、常染色体優性;スミス・レムリ・オピッツ症候群;スナイダー・ロビンソン症候群;成長ホルモン分泌腺腫;プロラクチノーマ;家族性、下垂体腺腫素因;ソトス症候群1または2;痙性失調症5、常染色体劣性、シャルルボワ・サグネ型、1,10または11、常染色体劣性;筋萎縮性側索硬化症5型;痙性対麻痺15,2,3,35,39,4、常染色体優性、55、常染色体劣性、および5A;胆汁酸合成障害、先天性、3;精子形成不全11,3および8;球状赤血球症4型および5型;球状体ミオパチー;脊髄性筋萎縮症、下肢優位2、常染色体優性;脊髄性筋萎縮症、II型;脊髄小脳失調症14,21,35,40および6;脊髄小脳失調症、常染色体劣性1および16;脾臓低形成;脊椎手根骨足根骨癒合症候群;脊椎手掌異形成、エーラス・ダンロス症候群様、免疫調節異常を伴う、アグリカン型、先天性関節脱臼を伴う、短肢-手型、セダガッテン(Sedaghatian)型、錐体桿体ジストロフィーを伴う、およびコズロウスキー型;捩れ小人症;シュタルガルト病1;錐体桿体ジストロフィー3;スティックラー症候群1型;クニースト(Kniest)異形成症;スティックラー症候群、1型(非症候性眼性)および4型;スティング関連脈管障害、小児期発症;ストームオルケン症候群;スタージ・ウェーバー症候群、毛細血管奇形、先天性、1;サクシニル-CoAアセト酢酸転移酵素欠損症;スクラーゼ-イソマルターゼ欠損症;乳児突然死症候群;亜硫酸酸化酵素欠損症、独立型;大動脈弁上狭窄;肺サーファクタント代謝機能障害、2および3;指節癒合症、近位、1b;セナニー・レンツ型合指症;3型合指症;

症候性X連鎖性精神遅滞16;内反尖足;タンジール病;TARP症候群;テイ・サックス病、B1バリアント、Gm2ガングリオシドーシス(成人)、Gm2ガングリオシドーシス(成人発症);テムタリー(Temtamy)症候群;テノリオ症候群;肢端骨異形成;テストステロン17-ベータ-デヒドロゲナーゼ欠損症;無四肢症、常染色体劣性;ファロー四徴症;左心低形成症候群2;動脈瘤;心臓および大血管の奇形;心室中隔欠損症1;ティール・ベーンケ(Thiel-Behnke)角膜ジストロフィー;胸部大動脈瘤および大動脈解離;マルファン様体型;3M症候群2;血小板減少症、血小板機能障害、溶血、およびグロビン合成不均衡;血小板減少症、X連鎖性;血栓症、遺伝性、プロテインC欠損症に起因、常染色体優性および劣性;甲状腺無形成;甲状腺がん、濾胞性;甲状腺ホルモン代謝異常;甲状腺ホルモン抵抗性、汎発性、常染色体優性;甲状腺中毒性周期性四肢麻痺および甲状腺中毒性周期性四肢麻痺2;サイトロピン放出ホルモン抵抗性、汎発性;チモシー症候群;TNF受容体関連周期熱症候群(TRAPS);歯無発生、選択的、3および4;多形性心室頻拍(Torsades de pointes);タウンズ・ブロックス鰓弓耳腎様症候群;新生児の一過性表皮水疱症;トリーチャー・コリンズ症候群1;精神遅滞、小人症、および網膜の色素変性を伴う長睫毛症;三叉神経節異形成症I型;三叉神経節症候群3型;トリメチルアミン尿症;結節性硬化症症候群;リンパ管筋腫症;結節性硬化症1および2;チロシナーゼ陰性眼皮膚白皮症;チロシナーゼ陽性眼皮膚白皮症;チロシン血症I型;UDPグルコース-4-エピメラーゼ欠損症;ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー;重度の四肢欠損を伴う尺骨・腓骨欠損症;アップショー・シュールマン症候群;ウロカニン酸加水酵素欠損症;アッシャー症候群、1型,1B型,1D型,1G型,2A型,2C型および2D型;網膜色素変性症39;紫外線感受性症候群;ファン・デル・ウーデ(Van der Woude)症候群;ヴァン・マルダーゲム(Van Maldergem)症候群2;ヘンカムリンパ管拡張症-リンパ浮腫症候群2;異型ポルフィリン症;嚢胞性腎疾患を伴う脳室拡大;ヴェルヘイ(Verheij)症候群;超長鎖アシル-CoA脱水素酵素欠損症;膀胱尿管逆流症8;内臓逆位5、常染色体;腹部ミオパチー;ビタミンD依存性くる病、1型および2型;卵黄型ジストロフィー;フォン・ヴィルブランド病2M型および3型;ワールデンブルグ症候群1型,4C型および2E型(神経学的病変を伴う);クライン・ワールデンブルグ症候群;ウォーカー・ワールブルグ先天性筋ジストロフィー;ワールブルグ・マイクロ症候群2および4;イボ、低ガンマグロブリン血症、感染症、および骨髄性細胞貯留;ウィーバー症候群;ヴァイユ・マルケザーニ症候群1および3;ヴァイユ・マルケザーニ様症候群;ワイセンバッハー・ツウェイミュラー(Weissenbacher-Zweymuller)症候群;ウェルドニッヒ・ホフマン病;シャルコー・マリー・トゥース病;ウェルナー症候群;WFS1関連障害;ウィデマン・スタイナー症候群;ウィルソン病;ウォルフラム様症候群、常染色体優性;ワース(Worth)病;ファン・ブッヘム病2型;色素性乾皮症、相補群b,群D,群Eおよび群G;X連鎖無ガンマグロブリン血症;X連鎖性 遺伝性運動感覚性ニューロパチー;ステリルスルファターゼ欠損症を伴うX連鎖性魚鱗癬;X連鎖性脳室周囲異所性灰白質;耳口蓋指症候群、I型;X連鎖性重症複合免疫不全症;チンメルマン・レーバンド(Zimmermann-Laband)症候群およびチンメルマン・レーバンド症候群2;ならびに小帯(Zonular)粉状白内障3。

【０９７３】

標的ヌクレオチド配列は、疾患、障害、または疾病に関連する標的配列(例えば点変異)を含み得る。標的配列は疾患、障害、または疾病に関連するT→C(またはA→G)の点変異を含み得、変異体C塩基の脱アミノ化は、疾患、障害、または疾病に関連しない配列へのミスマッチ修復によって媒介される修正をもたらす。標的配列は疾患、障害、または疾病に関連するG→A(またはC→T)の点変異を含み得、変異体A塩基の脱アミノ化は、疾患、障害、または疾病に関連しない配列へのミスマッチ修復によって媒介される修正をもたらす。標的配列はタンパク質をコードし得、点変異がコドンにあるところでは、野生型コドンと比較して変異体コドンによってコードされるアミノ酸の変化をもたらす。標的配列はスプライス部位にもまたあり得、点変異は野生型転写物と比較してmRNA転写物のスプライシングの変化をもたらす。加えて、標的は遺伝子の非コード配列、例えばプロモーターにもまたあり得、点変異は遺伝子の増大または減少した発現をもたらす。

【０９７４】

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

【０９７５】

細胞を組成物またはrAAV粒子と接触させることが関わる本明細書に記載の方法は、in vitroで、ex vivoで、またはin vivoで生起し得る。ある態様において、接触させるステップは対象に生起する。ある態様において、対象は疾患、障害、または疾病と診断されている。

【０９７６】

いくつかの態様では、本明細書に開示の方法には、哺乳類細胞を組成物またはrAAV粒子と接触させることが関わる。具体的な態様では、方法には、網膜細胞、皮質細胞、または小脳細胞に接触することが関わる。

【０９７７】

本明細書に記載の方法を用いて送達される分裂されたCas9タンパク質または分裂されたプライム編集因子は、好ましくは、元のCas9タンパク質またはプライム編集因子(すなわち、丸ごと細胞に送達または細胞によって発現される未分裂のタンパク質)と比較して遜色ない活性を有する。例えば、分裂されたCas9タンパク質または分裂されたプライム編集因子は、元のCas9タンパク質またはプライム編集因子の活性の少なくとも50%(例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%)を保持する。いくつかの態様では、分裂されたCas9タンパク質または分裂されたプライム編集因子は、元のCas9タンパク質またはプライム編集因子のものよりも(例えば、2倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、またはより多く)活性である。

【０９７８】

本明細書に記載の組成物は、対象が患っている疾患または障害を処置および/または防止するための治療学的有効量でその必要がある対象に投与され得る。CRISPR/Cas9に基づくゲノム編集テクノロジーを用いて処置および/または防止され得るいずれかの疾患または障害は、本明細書に記載の分裂されたCas9タンパク質または分裂された多重フラッププライム編集因子によって処置され得る。分裂されたCas9タンパク質または多重フラッププライム編集因子をコードするヌクレオチド配列がさらにgRNAをコードしない場合には、gRNAをコードする別個の核酸ベクターが本明細書に記載の組成物と一緒に投与され得るということは理解されるはずである。

【０９７９】

例示の好適な疾患、障害、または疾病は、限定なしに:嚢胞性線維症、フェニルケトン尿症、表皮剥離性角質増殖症(EHK)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、シャルコー・マリー・トゥース病4J型、神経芽腫(NB)、フォン・ヴィレブランド病(vWD)、先天性ミオトニー、遺伝性腎アミロイドーシス、拡張型心筋症、遺伝性リンパ浮腫、家族性アルツハイマー病、プリオン病、慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA)、先天性難聴、ニーマン・ピック病C型(NPC)疾患、およびデスミン関連ミオパチー(DRM)からなる群から選択される疾患または障害を包含する。具体的な態様では、疾患または疾病はニーマン・ピック病C型(NPC)疾患である。

【０９８０】

いくつかの態様では、疾患、障害、または状態はNPC遺伝子、DNMT1遺伝子、PCSK9遺伝子、またはTMC1遺伝子の点変異に関連する。ある態様において、点変異はNPCのT3182C変異であり、これはI1061Tアミノ酸置換をもたらす。

【０９８１】

ある態様において、点変異はTMC1のA545G変異であり、これはY182Cアミノ酸置換をもたらす。TMC1は内耳の感覚有毛細胞の機械受容イオンチャネルを形成するタンパ

ク質をコードし、正常な聴覚機能に要求される。Y182Cアミノ酸置換は先天性難聴に関連する。

【０９８２】

いくつかの態様では、疾患、障害、または疾病は、停止コドン、例えば遺伝子のコード領域内の未成熟停止コドンを生成する点変異に関連する。

【０９８３】

追加の例示の疾患、障害、または疾病は、嚢胞性線維症(例えば、Schwank et al.,Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients.Cell stem cell.2013;13:653-658;およびWu et.al.,Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. Cell stem cell.2013;13:659-662を見よ。これらのいずれも、遺伝子欠陥を修正するためにデアミナーゼ融合タンパク質を用いていない);フェニルケトン尿症－例えば、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ遺伝子の位置835(マウス)もしくは240(ヒト)または相同残基におけるフェニルアラニン→セリンの変異(T＞C変異)－例えばMcDonald et al.,Genomics.1997;39:402-405を見よ;ベルナール・スーリエ症候群(BSS)－例えば、血小板膜糖タンパク質IXの位置55もしくは相同残基におけるフェニルアラニン→セリンの変異または残基24もしくは相同残基におけるシステイン→アルギニン(T＞C変異)－例えばNoris et al.,British Journal of Haematology.1997;97:312-320およびAli et al.,Hematol.2014;93:381-384を見よ;表皮剥離性角質増殖症(EHK)－例えば、ケラチン1の位置160もしくは161(開始メチオニンをカウントする場合)または相同残基におけるロイシン→プロリンの変異(T＞C変異)－例えば、Chipev et al.,Cell.1992;70:821-828を見よ。www[dot]uniprot[dot]orgのUNIPROTデータベースのアクセッション番号P04264をもまた見よ;慢性閉塞性肺疾患(COPD)－例えば、α_1-アンチトリプシンのプロセシングされた形態の位置54もしくは55(開始メチオニンをカウントする場合)または相同残基あるいはプロセシングされない形態の残基78または相同残基におけるロイシン→プロリンの変異(T＞C変異)－例えば、Poller et al.,Genomics.1993;17:740-743を見よ。UNIPROTデータベースのアクセッション番号P01011をもまた見よ;シャルコー・マリー・トゥース病4J型 - 例えばFIG4の位置41または相同残基におけるイソロイシン→トレオニンの変異(T＞C変異)－例えば、Lenk et al.,PLoS Genetics.2011;7:e1002104を見よ;神経芽腫(NB)－例えば、カスパーゼ-9の位置197または相同残基におけるロイシン→プロリンの変異(T＞C変異)－例えば、Kundu et al.,3 Biotech.2013,3:225-234を見よ;フォン・ヴィレブランド病(vWD)－例えば、フォン・ヴィレブランド因子のプロセシングされた形態の位置509もしくは相同残基またはフォン・ヴィレブランド因子のプロセシングされない形態の位置1272もしくは相同残基におけるシステイン→アルギニンの変異(T＞C変異)－例えば、Lavergne et al.,Br.J.Haematol.1992を見よ。UNIPROTデータベースのアクセッション番号P04275をもまた見よ;82:66-72;先天性ミオトニー－例えば、筋肉塩素チャネル遺伝子CLCN1の位置277または相同残基におけるシステイン→アルギニンの変異(T＞C変異)－例えば、Weinberger et al.,The J.of Physiology.2012;590:3449-3464を見よ;遺伝性腎アミロイドーシス－例えば、アポリポタンパク質AIIのプロセシングされた形態の位置78もしくは相同残基またはプロセシングされない形態の位置101もしくは相同残基における停止コドン→アルギニンの変異(T＞C変異)－例えば、Yazaki et al.,Kidney Int.2003;64:11-16を見よ;拡張型心筋症(DCM)－例えば、FOXD4遺伝子の位置148または相同残基におけるトリプトファン→アルギニンの変異(T＞C変異)、例えば、Minoretti et.al.,Int.J.of Mol.Med.2007;19:369-372を見よ;遺伝性リンパ浮腫 - 例えば、VEGFR3チロシンキナーゼの位置1035または相同残基におけるヒスチジン→アルギニンの変異(A＞G変異)、例えば、Irrthum et al.,Am.J.Hum.Genet.2000;67:295-301を見よ;家族性アルツハイマー病－例えば、プレセニリン1の位置143または相同残基におけるイソロイシン→バリンの変異(A＞G変異)、例えば、Gallo et.al.,J.Alzheimer's Disease.2011;25:425-431を見よ;プリオン病－例えば、プリオンタンパク質

の位置129または相同残基におけるメチオニン→バリンの変異(A＞G変異)－例えば、Lewis et.al.,J.of General Virology.2006;87:2443-2449を見よ;慢性乳児神経皮膚関節症候群(CINCA)－例えば、クリオピリンの位置570または相同残基におけるチロシン→システインの変異(A＞G変異)－例えば、Fujisawa et.al.Blood.2007;109:2903-2911を見よ;ならびにデスミン関連ミオパチー(DRM)－例えば、αβクリスタリンの位置120または相同残基におけるアルギニン→グリシンの変異(A＞G変異)を包含する。例えば、Kumar et al.,J.Biol.Chem.1999;274:24137-24141を見よ。全ての参照およびデータベースエントリーの内容全体は参照によって本願に組み込まれる。

【０９８４】

トリヌクレオチド反復拡大疾患

トリヌクレオチド反復拡大は、ハンチントン病、脆弱X症候群、およびフリードライヒ運動失調症を包含するいくつものヒト疾患に関連する。最も普通のトリヌクレオチド反復はCAGトリプレットを含有するが、GAAトリプレット(フリードライヒ運動失調症)およびCGGトリプレット(脆弱X症候群)もまた生起する。拡大の素因を受け継ぐことまたはすでに伸長した親のアレルを獲得することは、疾患を獲得する蓋然性を増大させる。トリヌクレオチド反復の病原性の拡大は仮説上、多重フラッププライム編集を用いて修正され得る。

【０９８５】

図1Gまたは図22に概説されている一般的な機序に従って、反復領域の上流の領域が、RNAによってガイドされるヌクレアーゼによってニッキングされ得、次いで、健康な反復数(これは具体的な遺伝子および疾患に依存する)を含有する新たなDNA鎖の合成をプライムするために用いられ得る。反復配列の後には、反復の他端に隣接する配列の同一性にマッチする相同性の短いストレッチが追加される(赤色の鎖)。TPRTシステムによる新たに合成された鎖の侵入、および新たに合成されたフラップによる内生DNAの続く置き換えは、短縮された反復アレルに至る。用語「短縮された」はヌクレオチド反復領域の長さの短くなることを言い、それによって、トリヌクレオチド反復領域を修復することをもたらす。

【０９８６】

本明細書に記載の多重フラッププライム編集システム(例えば二重フラップまたは四重フラッププライム編集システム)は、ハンチントン病および他のトリヌクレオチド反復障害などの疾病を処置するために、トリヌクレオチド反復変異(または「トリプレット拡大疾患」)を短縮するために用いられ得る。トリヌクレオチド反復拡大障害は発達神経生物学が関わる複雑な進行性の障害であり、多くの場合には、認知および感覚運動機能に影響する。障害は遺伝学的な表現促進現象(すなわち、各世代での増大した重症度)を示す。DNA伸長または短縮は、通常は減数分裂的に(すなわち、配偶子形成の時の間に、または胚発生中に早期に)起こり、多くの場合には性バイアスを有し、いくつかの遺伝子は女性から受け継がれるときにのみ、他は男性からのみ伸長するということを意味する。ヒトでは、トリヌクレオチド反復拡大障害は転写または翻訳レベルどちらかで遺伝子サイレンシングを引き起こし得、これは本質的に遺伝子機能をノックアウトする。代替的には、トリヌクレオチド反復拡大障害は、大きい繰り返しアミノ酸配列を有して生成された変改されたタンパク質を引き起こし得る。これは、多くの場合にはドミナントネガティブな様式で(例えばポリグルタミン疾患)、タンパク質機能を無効化するかまたは変化させるかどちらかである。

【０９８７】

理論によって拘束されることなしに、トリプレット拡大はDNA複製またはDNA修復合成の間のスリップによって引き起こされる。タンデム反復は互いに同一の配列を有するので、2つのDNA鎖間の塩基対形成は配列上の複数の点において生起し得る。これはDNA複製またはDNA修復合成の間の「ループアウト」構造の形成に至り得る。これは繰り返し配列の繰り返しのコピーに至り得、反復数を伸長させる。ハイブリッドRNA:DNA中間体が関わる追加の機序が提案されている。多重フラッププライム編集は、害をなす繰り返

しのコドントリプレットの1以上を欠失させることによって、これらのトリプレット拡大領域を縮減または消去するために用いられ得る。この使用のある態様では、図23が、プライム編集によってトリヌクレオチド反復配列を短縮または縮減するためのPEgRNAデザインの模式図を提供する。

【０９８８】

多重フラッププライム編集は、カットされる部位へと標的化される充当されたPEgRNAを含むプライム編集因子によって、トリプレット反復領域の上流の領域へニックを入れることによって、トリプレット拡大領域を短縮するように実装され得る。次いで、プライム編集因子は、健康な数のトリプレット反復(これは具体的な遺伝子および疾患に依存する)をコードする鋳型(すなわち、その編集鋳型)としてのPEgRNAに基づく新たなDNA鎖(ssDNAフラップ)を合成する。新たに合成されたssDNA鎖は健康なトリプレット反復配列を含み、また、反復の他端に隣接する配列にマッチする相同性の短いストレッチ(すなわち相同アーム)を包含するように合成される(赤色の鎖)。新たに合成された鎖の侵入、および新たに合成されたssDNAフラップによる内生DNAの続く置き換えは、短縮された反復アレルに至る。

【０９８９】

具体的なトリヌクレオチド伸長障害に依存して、欠陥を誘導するトリプレット拡大は「トリヌクレオチド反復拡大タンパク質」において生起し得る。トリヌクレオチド反復拡大タンパク質は、トリヌクレオチド反復拡大障害を発生する感受性、トリヌクレオチド反復拡大障害の存在、トリヌクレオチド反復拡大障害の重症度、またはそれらのいずれかの組み合わせに関連するタンパク質の多様なセットである。トリヌクレオチド反復拡大障害は反復の型によって決定される2つのカテゴリーに分けられる。最も普通の反復はトリプレットCAGであり、これは遺伝子のコード領域に存在するときにはアミノ酸のグルタミン(Q)をコードする。よって、これらの障害はポリグルタミン(ポリQ)障害と言われ、次の疾患を含む:ハンチントン病(HD);球脊髄性筋萎縮症(SBMA);脊髄小脳失調症(SCA1、2、3、6、7、および17型);および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)。残りのトリヌクレオチド反復拡大障害にはCAGトリプレットが関わらないか、またはCAGトリプレットが遺伝子のコード領域にはないかどちらかであり、よって、非ポリグルタミン障害と言われる。非ポリグルタミン障害は、脆弱X症候群(FRAXA);脆弱XE精神遅滞(FRAXE);フリードライヒ運動失調症(FRDA);筋強直性ジストロフィー(DM);および脊髄小脳失調症(SCA 8および12型)を含む。

【０９９０】

トリヌクレオチド反復拡大障害に関連するタンパク質は、トリヌクレオチド反復拡大障害に対するトリヌクレオチド反復拡大障害に関連するタンパク質の実験的関連に基づいて選択され得る。例えば、トリヌクレオチド反復拡大障害に関連するタンパク質の生産速度または循環濃度は、トリヌクレオチド反復拡大障害を欠く集団に対して相対的に、トリヌクレオチド反復拡大障害を有する集団において上昇または降下し得る。タンパク質レベルの違いは、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、および質量分析を包含するがこれらに限定されないプロテオミクス技術を用いて評価され得る。代替的には、トリヌクレオチド反復拡大障害に関連するタンパク質はタンパク質をコードする遺伝子の遺伝子発現プロファイルを得ることによって同定され得、DNAマイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析(SAGE)、および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(Q-PCR)を包含するがこれらに限定されないゲノム技術を用いる。

【０９９１】

多重フラッププライム編集によって修正され得るトリヌクレオチド反復拡大障害に関連するタンパク質の限定しない例は、AR(アンドロゲン受容体)、FMR1(脆弱X精神遅滞1)、HTT(ハンチンチン)、DMPK(筋緊張性ジストロフィータンパク質キナーゼ)、FXN(フラタキシン)、ATXN2(アタキシン2)、ATN1(アトロフィン1)、FEN1(フラップ構造特異的エンドヌクレアーゼ1)、TNRC6A(トリヌクレオチド反復含有6A)、PABPN1(核ポリA結合タンパク質1)、JPH3(ジャンクトフィリン3)、MED15(メディエーター複合体

サブユニット15)、ATXN1(アタキシン1)、ATXN3(アタキシン3)、TBP(TATAボックス結合タンパク質)、CACNA1A(電位依存性カルシウムチャネルP/Q型アルファ1Aサブユニット)、ATXN80S(ATXN8対向鎖(非タンパク質コード))、PPP2R2B(タンパク質ホスファターゼ2制御サブユニットBベータ)、ATXN7(アタキシン7)、TNRC6B(トリヌクレオチド反復含有6B)、TNRC6C(トリヌクレオチド反復含有6C)、CELF3(CUGBP Elav様ファミリーメンバー3)、MAB21L1(mab-21様1(C.elegans))、MSH2(mutSホモログ2結腸がん非ポリポーシス1型(E.coli))、TMEM185A(膜貫通タンパク質185A)、SIX5(SIXホメオボックス5)、CNPY3(canopy 3ホモログ(ゼブラフィッシュ))、FRAXE(脆弱部位、葉酸型、稀、fra(X)(q28)E)、GNB2(グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)ベータポリペプチド2)、RPL14(リボソームタンパク質L14)、ATXN8(アタキシン8)、INSR(インスリン受容体)、TTR(トランスサイレチン)、EP400(E1A結合タンパク質p400)、GIGYF2(GRB10相互作用GYFタンパク質2)、OGG1(8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ)、STC1(スタニオカルシン1)、CNDP1(カルノシンジペプチダーゼ1(メタロペプチダーゼM20ファミリー))、C10orf2(染色体10オープンリーディングフレーム2)、MAML3 mastermind様3(Drosophila)、DKC1(先天性角化不全症1、ジスケリン)、PAXIP1(PAX相互作用(転写活性化ドメイン)タンパク質1)、CASK(カルシウム/カルモジュリン依存性セリンタンパク質キナーゼ(MAGUKファミリー))、MAPT(微小管関連タンパク質tau)、SP1(Sp1転写因子)、POLG(ポリメラーゼ(DNA依存性)ガンマ)、AFF2(AF4/FMR2ファミリーメンバー2)、THBS1(トロンボスポンジン1)、TP53(腫瘍タンパク質p53)、ESR1(エストロゲン受容体1)、CGGBP1(CGGリプレット反復結合タンパク質1)、ABT1(基本転写活性化因子1)、KLK3(カリクレイン関連ペプチダーゼ3)、PRNP(プリオンタンパク質)、JUN(junがん遺伝子)、KCNN3(カリウム中/小コンダクタンスカルシウム活性化チャネルサブファミリーNメンバー3)、BAX(BCL2関連Xタンパク質)、FRAXA(脆弱部位、葉酸型、稀、fra(X)(q27.3)A(巨睾丸、精神遅滞))、KBTBD10(kelch反復およびBTB(POZ)ドメイン含有10)、MBNL1(muscleblind様(Drosophila))、RAD51(RAD51ホモログ(RecAホモログ、E.coli)(S.cerevisiae))、NCOA3(核受容体コアクチベーター3)、ERDA1(伸長した反復ドメインCAG/CTG1)、TSC1(結節性硬化症1)、COMP(軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質)、GCLC(グルタミン酸-システインリガーゼ触媒サブユニット)、RRAD(糖尿病に関連するRas関連)、MSH3(mutSホモログ3(E.coli))、DRD2(ドーパミン受容体D2)、CD44(CD44分子(インド人血液型))、CTCF(CCCTC結合因子(ジンクフィンガータンパク質))、CCND1(サイクリンD1)、CLSPN(クラスピンホモログ(Xenopus laevis))、MEF2A(筋細胞エンハンサー因子2A)、PTPRU(タンパク質チロシンホスファターゼ受容体型U)、GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ)、TRIM22(三節型モチーフ含有22)、WT1(ウィルムス腫瘍1)、AHR(アリール炭化水素受容体)、GPX1(グルタチオンペルオキシダーゼ1)、TPMT(チオプリンS-メチルトランスフェラーゼ)、NDP(ノリエ病(偽神経膠腫))、ARX(aristaless関連ホメオボックス)、MUS81(MUS81エンドヌクレアーゼホモログ(S.cerevisiae))、TYR(チロシナーゼ(眼皮膚白皮症IA))、EGR1(初期増殖応答1)、UNG(ウラシル-DNAグリコシラーゼ)、NUMBL(numbホモログ(Drosophila)様)、FABP2(腸脂肪酸結合タンパク質2)、EN2(engrailedホメオボックス2)、CRYGC(クリスタリンガンマC)、SRP14(シグナル認識粒子14kDa(相同的Alu RNA結合タンパク質))、CRYGBクリスタリンガンマB)、PDCD1(プログラム細胞死1)、HOXA1(ホメオボックスA1)、ATXN2L(アタキシン2様)、PMS2(PMS2減数分裂後分離増大2(S.cerevisiae))、GLA(ガラクトシダーゼアルファ)、CBL(Cas-Br-M(ネズミ)同種指向性レトロウイルス形質転換配列)、FTH1(フェリチン重鎖ポリペプチド1)、IL12RB2(インターロイキン12受容体ベータ2)、OTX2(orthodenticleホメオボックス2)、HOXA5(ホメオボックスA5)、POLG2(ポリメラーゼ(DNA依存性)ガンマ2補助的サブユニット)、DLX2(distal-lessホメオボックス2)、SIRPA(シグナル制御タンパク質アルファ)、OTX1(orthodenticleホメオボックス1)、AHRR(アリール炭化水素受容体リプレッサー)、MANF(中脳アストロサイト由来神経栄養因子)、TMEM158(膜貫通タン

パク質158(遺伝子/偽遺伝子))、およびENSG00000078687を包含する。

【０９９２】

具体的な側面において、本開示は、拡大反復障害(また反復拡大障害もしくはトリヌクレオチド反復障害としても知られている)と診断された対象の処置のためのTPRTベースの方法を提供する。拡大反復障害は、マイクロサテライト反復が長さ閾値を超えて拡大したときに生じる。目下、少なくとも30の遺伝的疾患は、反復拡大によって引き起こされるものと考えられている。この多様な群の障害への科学的理解は、1990年代初頭に、トリヌクレオチド反復が、脆弱X、球脊髄性筋萎縮症、筋強直症ジストロフィー、およびハンチントン病(Nelson et al,"The unstable repeats-three evolving faces of neurological disease,"Neuron,March 6,2013,Vol.77;825-843(これは参照により本明細書に組み込まれる))、ならびにホー・リバー(Haw River)症候群、ヤコブセン症候群、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、マシャド・ジョセフ病、合多指症(SPD II)、手足生殖器症候群(HFGS)、鎖骨頭蓋異形成症(CCD)、全前脳欠損障害(HPE)、先天性中枢性低換気症候群(CCHS)、ARX非症候性のX連鎖精神遅滞(XLMR)、および眼咽頭型筋ジストロフィー(OPMD)(参照を包含する、数種の主要な遺伝性疾病にあるという発見で明るみに出た。マイクロサテライト反復の不安定性は、反復拡大が、後に続く各世代に生じ得、子孫におけるより重度の表現型および発症の低年齢へ繋がるという現象が予想されたとおり、これらの疾病の証であることが見出された。反復拡大は、数種の異なる機序を介して疾患を引き起こすものと考えられている。つまり、拡大は、遺伝子、mRNA転写産物、および/またはコードされたタンパク質のレベルにて機能する細胞に干渉し得る。いくつかの疾病において、突然変異は、反復含有遺伝子をサイレンシングすることによる機能喪失型の機序を介して作用する。その他において、疾患は、mRNA転写産物またはタンパク質のいずれかが新しい異常な機能を帯びるようになる機能獲得型の機序の結果として生じる。

【０９９３】

一態様において、トリヌクレオチド反復障害を処置する方法は、図23に描かれている。一般に、アプローチは、プライム編集プロセスの機序を通して内生の罹患トリヌクレオチド反復配列を置き換えることが意図される、所望されかつ健常な置き換えトリヌクレオチド反復配列をコードする領域を含む伸長されたgRNAと組み合わせて、TPRTゲノム編集(すなわち、多重フラッププライム編集)を使用することを伴う。例示の、トリヌクレオチド反復配列を縮小するためのgRNAデザインおよびTPRTゲノム編集(すなわち、多重フラッププライム編集)でのトリヌクレオチド反復縮小の概略図が、図23に示される。

【０９９４】

プリオン病

多重フラッププライム編集は、疾患の過程においてミスフォールディングされるようになるプリオンタンパク質(PRNP)上への1以上の防護性変異の組み入れによって、プリオン病を防止またはその進行を停止させるためにもまた用いられ得る。プリオン病または伝達性海綿状脳症(TSE)は、ヒトおよび動物両方を冒す稀な進行性の神経変性障害のファミリーである。それらは、長い潜伏期間、ニューロン喪失に関連する特徴的な海綿状変化、および炎症性応答を誘導することの失敗によって見分けられる。

【０９９５】

ヒトでは、プリオン病は、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群、致死性家族性不眠症、およびクールー病を包含する。動物では、プリオン病は牛海綿状脳症(BSEまたは「狂牛病」)、慢性消耗病(CWD)、スクレイピー、伝達性ミンク脳症、ネコ海綿状脳症、および有蹄類海綿状脳症を包含する。これらのプリオン病のいずれか1つを防止またはその進行を停止させるために、多重フラッププライム編集は防護性の点変異をプリオンタンパク質上に組み入れるために用いられ得る。

【０９９６】

古典的CJDはヒトプリオン病である。それは、特徴的な臨床および診断特色を有する

神経変性障害である。この疾患は急速に進行性であり、常に致死的である。この疾患による感染は通常は病気の発症から1年以内に死に至る。CJDは急速に進行性の変わることなく致死的な神経変性障害であり、プリオンタンパク質として公知の細胞性の糖タンパク質の異常なアイソフォームによって引き起こされると信じられている。CJDは世界的に生起し、米国を包含する多くの国の見積もられる年間発生率は100万人の集団あたり約1ケースであることが報告されている。CJD患者の大多数は通常は病気の発症から１年以内に死ぬ。CJDは、ヒトおよび動物において生起する他のプリオン病と併せて、伝達性海綿状脳症(TSE)として分類される。患者の約85％では、CJDは伝達の認識可能なパターンなしに特発性疾患として生起する。患者のより小さい割合(5～15％)は、プリオンタンパク質遺伝子の受け継がれた変異ゆえにCJDを発生する。これらの受け継がれる形態は、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群および致死性家族性不眠症を包含する。CJDについて、処置は現行では公知ではない。

【０９９７】

変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)は英国で1996年に最初に記載されたプリオン病である。今や、牛のプリオン病の牛海綿状脳症(BSEまたは「狂牛」病)のアウトブレイクを担う物質が、ヒトのvCJDのアウトブレイクを担う同じ物質であるという強い科学的証拠がある。バリアントCJD(vCJD)は古典的CJD(多くの場合には単純にCJDと呼ばれる)と同じ疾患ではない。それは古典的CJDとは異なる臨床的および病理学的特徴を有する。各疾患はプリオンタンパク質遺伝子の具体的な遺伝子プロファイルをもまた有する。両方の障害は、年で測定される普通でなく長い潜伏期間を有する変わることなく致死的な脳疾患であり、プリオンと呼ばれる非従来的な伝達性物質によって引き起こされる。vCJDについて、処置は現行では公知ではない。

【０９９８】

BSE(牛海綿状脳症または「狂牛病」)は、プリオンと呼ばれる普通でない伝達性物質による感染からもたらされる畜牛の進行性の神経学的障害である。伝達性物質の性質は良く理解されてはいない。現行では、最も受け入れられた理論は、物質が、プリオンタンパク質として公知の正常タンパク質の改変された形態であるということである。まだ理解されていない理由から、正常なプリオンタンパク質は病原性の(有害な)形態へと変化し、これは次いで畜牛の中枢神経系を損傷する。BSEの異なる株があるという増大して行く証拠がある:英国におけるアウトブレイクを担った典型的または古典的BSE株および2つの非典型的な株(HおよびL株)である。BSEについて、処置は現行では公知ではない。

【０９９９】

慢性消耗病(CWD)は、鹿、ヘラジカ、トナカイ、ニホンジカ、およびムースを冒すプリオン病である。それはカナダおよび米国を包含する北米、ノルウェー、ならびに韓国のいくつかのエリアにおいて見出されている。感染動物が症状を発生する前には1年超がかかり得、これらは激しい体重減少(消耗)、よろめき、無気力、および他の神経症状を包含し得る。CWDは全ての年齢の動物を冒し得、いくつかの感染動物はいつか疾患を発生することなしに死に得る。CWDは動物にとって致死的であり、処置またはワクチンはない。

【１０００】

TSEの原因物質はプリオンであると信じられている。用語「プリオン」は、伝達性であり、脳に最も豊富に見出されるプリオンタンパク質と呼ばれる特定の正常な細胞性タンパク質の異常なフォールディングを誘導する能力がある異常な病原性物質を言う。これらの正常なプリオンタンパク質の機能はなお完全には理解されていない。プリオンタンパク質の異常なフォールディングは脳損傷と疾患の特徴的な徴候および症状とに至る。プリオン病は通常は急速に進行性であり、常に致死的である。

【１００１】

本願において用いられる用語「プリオン」は、ヒトおよび動物の疾患(海綿状脳症)を引き起こすことが公知の感染性粒子を意味する。用語「プリオン」は単語「タンパク質」および「感染」の短縮であり、粒子は、専らではないにしても、大きくは、立体配座を変化

させてPRNP^{Sc}になるPRNP^{C}を発現するPRNP遺伝子によってコードされるPRNP^{Sc}分子からなる。プリオンは細菌、ウイルス、およびウイロイドとは別物である。公知のプリオンは、動物に感染して、羊および山羊の神経系の伝達性の変性疾患スクレイピー、ならびに牛海綿状脳症(BSE)または狂牛病および猫のネコ海綿状脳症を引き起こすものを包含する。ヒトを冒すことが公知の上で論じられている4つのプリオン病は(1)クールー病、(2)クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、(3)ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、および(4)致死性家族性不眠症(FFI)である。本願において用いられるプリオンは、用いられるいずれかの動物、具体的にはヒトおよび飼育畜産動物においてこれらの疾患または他の全てまたはいずれかを引き起こすプリオンの全ての形態を包含する。

【１００２】

一般的に、理論によって拘束されることなしに、プリオン病はプリオンタンパク質のミスフォールディングによって引き起こされる。多くの場合に沈着性疾患と呼ばれるかかる疾患、プリオンタンパク質のミスフォールディングは次のとおり説明され得る。Aが、意図される生理的役割をモノマーまたはオリゴマー状態で実行する正常に合成された遺伝子産物であり、かつA*が、劇的な立体配座変化を経過するために有能であるAの立体配座的に活性化された形態である場合には、Bは多量体アセンブリを好む立体配座的に変改された状態であり(すなわち、沈着を形成するミスフォールディングされた形態)、かつB_nは、病原性であり、リサイクルすることが相対的に困難である多量体材料である。プリオン病では、PRNP^{C}およびPRNP^{Sc}は状態AおよびB_nに対応し、ここで、Aは大きくはヘリカルかつモノマー性であり、B_nはβリッチかつ多量体性である。

【１００３】

プリオンタンパク質のある種の変異はプリオン(prior)病の増大したリスクに関連し得るということが公知である。反対に、プリオンタンパク質のある種の変異は天然に防護性であり得る。Bagynszky et al.,"Characterization of mutations in PRNP(prion)gene and their possible roles in neurodegenerative diseases,"Neuropsychiatr Dis Treat.,2018;14:2067-2085を見よ。これの内容は参照によって本願に組み込まれる。

【１００４】

PRNP(NCBI RefSeq No.NP_000302.1(配列番号291))ヒトプリオンタンパク質は、染色体20(4686151-4701588)上に位置付けられた16kb長の遺伝子によってコードされる。それは2つのエキソンを含有し、エキソン2はオープンリーディングフレームを持ち、これは253アミノ酸(AA)長のPrPタンパク質をコードする。エキソン1は非コードエキソンであり、これは転写開始部位としての用をなし得る。翻訳後修飾は最初の22AA N末端フラグメント(NTF)および最後の23AA C末端フラグメント(CTF)の除去をもたらす。NTFは小胞体(ER)へのPrP輸送後に切断され、CTF(グリコシルホスファチジルイノシトール[GPI]シグナルペプチド[GPI-SP])はGPIアンカーによって切断される。GPIアンカーはPrPタンパク質輸送に関わり得る。それは細胞膜の外側表面へのプリオンタンパク質の取り付けの役割をもまた演じ得る。正常なPrPは、長いN末端ループ(これはオクタペプチド反復領域を含有する)、2つの短いβシート、3つのαヘリックス、およびC末端領域(これはGPIアンカーを含有する)から成る。PrPの切断は、細胞膜にアンカー固定される208AA長の糖タンパク質をもたらす。

【１００５】

PRNP(NP_000302.1)の253アミノ酸配列は以下のとおりである:

MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYQRGSSMVLFSSPPV(配列番号291)。

【１００６】

PRNP(NP_000302.1)の253アミノ酸配列は、以下のヌクレオチド配列(NCBI Ref.

Seq No.NM_000311.5,"homo sapiens prion protein(PRNP),transcript variant 1,mRNA)によってコードされており、以下のとおりである:

GCGAACCTTGGCTGCTGGATGCTGGTTCTCTTTGTGGCCACATGGAGTGACCTGGG
CCTCTGCAAGAAGCGCCCGAAGCCTGGAGGATGGAACACTGGGGGCAGCCGATACC
CGGGGCAGGGCAGCCCTGGAGGCAACCGCTACCCACCTCAGGGCGGTGGTGGCTGG
GGGCAGCCTCATGGTGGTGGCTGGGGGCAGCCTCATGGTGGTGGCTGGGGGCAGCC
CCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCTCATGGTGGTGGCTGGGGTCAAGGAGGTGGCA
CCCACAGTCAGTGGAACAAGCCGAGTAAGCCAAAAACCAACATGAAGCACATGGCT
GGTGCTGCAGCAGCTGGGGCAGTGGTGGGGGGCCTTGGCGGCTACATGCTGGGAAG
TGCCATGAGCAGGCCCATCATACATTTCGGCAGTGACTATGAGGACCGTTACTATC
GTGAAAACATGCACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCCATGGATGAGTAC
AGCAACCAGAACAACTTTGTGCACGACTGCGTCAATATCACAATCAAGCAGCACAC
GGTCACCACAACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAGACCGACGTTAAGATGATGG
AGCGCGTGGTTGAGCAGATGTGTATCACCCAGTACGAGAGGGAATCTCAGGCCTAT
TACCAGAGAGGATCGAGCATGGTCCTCTTCTCCTCTCCACCTGTGATCCTCCTGATC
TCTTTCCTCATCTTCCTGATAGTGGGATGAGGAAGGTCTTCCTGTTTTCACCATCTT
TCTAATCTTTTTCCAGCTTGAGGGAGGCGGTATCCACCTGCAGCCCTTTTAGTGGT
GGTGTCTCACTCTTTCTTCTCTCTTTGTCCCGGATAGGCTAATCAATACCCTTGGCA
CTGATGGGCACTGGAAAACATAGAGTAGACCTGAGATGCTGGTCAAGCCCCCTTTG
ATTGAGTTCATCATGAGCCGTTGCTAATGCCAGGCCAGTAAAAGTATAACAGCAAA
TAACCATTGGTTAATCTGGACTTATTTTTGGACTTAGTGCAACAGGTTGAGGCTAA
AACAAATCTCAGAACAGTCTGAAATACCTTTGCCTGGATACCTCTGGCTCCTTCAG
CAGCTAGAGCTCAGTATACTAATGCCCTATCTTAGTAGAGATTTCATAGCTATTTA
GAGATATTTTCCATTTTAAGAAAACCCGACAACATTTCTGCCAGGTTTGTTAGGAG
GCCACATGATACTTATTCAAAAAAATCCTAGAGATTCTTAGCTCTTGGGATGCAGG
CTCAGCCCGCTGGAGCATGAGCTCTGTGTGTACCGAGAACTGGGGTGATGTTTTAC
TTTTCACAGTATGGGCTACACAGCAGCTGTTCAACAAGAGTAAATATTGTCACAAC
ACTGAACCTCTGGCTAGAGGACATATTCACAGTGAACATAACTGTAACATATATGA
AAGGCTTCTGGGACTTGAAATCAAATGTTTGGGAATGGTGCCCTTGGAGGCAACCT
CCCATTTTAGATGTTTAAAGGACCCTATATGTGGCATTCCTTTCTTTAAACTATAGG
TAATTAAGGCAGCTGAAAAGTAAATTGCCTTCTAGACACTGAAGGCAAATCTCCTT
TGTCCATTTACCTGGAAACCAGAATGATTTTGACATACAGGAGAGCTGCAGTTGTG
AAAGCACCATCATCATAGAGGATGATGTAATTAAAAAATGGTCAGTGTGCAAAGAA
AAGAACTGCTTGCATTTCTTTATTTCTGTCTCATAATTGTCAAAAACCAGAATTAG
GTCAAGTTCATAGTTTCTGTAATTGGCTTTTGAATCAAAGAATAGGGAGACAATCT
AAAAAATATCTTAGGTTGGAGATGACAGAAATATGATTGATTTGAAGTGGAAAAAG
AAATTCTGTTAATGTTAATTAAAGTAAAATTATTCCCTGAATTGTTTGATATTGTCA
CCTAGCAGATATGTATTACTTTTCTGCAATGTTATTATTGGCTTGCACTTTGTGAGT
ATTCTATGTAAAAATATATATGTATATAAAATATATATTGCATAGGACAGACTTAG
GAGTTTTGTTTAGAGCAGTTAACATCTGAAGTGTCTAATGCATTAACTTTTGTAAG
GTACTGAATACTTAATATGTGGGAAACCCTTTTGCGTGGTCCTTAGGCTTACAATG
TGCACTGAATCGTTTCATGTAAGAATCCAAAGTGGACACCATTAACAGGTCTTTGA
AATATGCATGTACTTTATATTTTCTATATTTGTAACTTTGCATGTTCTTGTTTTGTT
ATATAAAAAAATTGTAAATGTTTAATATCTGACTGAAATTAAACGAGCGAAGATGA
GCACCA(配列番号292)

【１００７】

CJDおよびFFIにリンクしているPRNP(NP_000302.1)に対して相対的な変異部位は報告されており、次のとおりである。これらの変異は本明細書に開示の多重フラッププライム編集因子を用いて除去または組み入れられ得る。

【表６３－１】

突然変異	CJDプリオン病へ繋がる突然変異PRNPのアミノ酸配列(BAGYNSZKY ET AL., 2018の表1を参照)(PRNP NP_000302.1の配列番号291と比べて)
D178N	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHNCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3940）
T188K	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK

【表６３－２】

	HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHKVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3941）
E196K	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGKNFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号 295）
E196A	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGANFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号296 ）
E200K	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTKTDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3943）
E200G	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTGTDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号 ）
V203I	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV（配列番号3944）
R208H	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMEHVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3945）
V210I	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVIEQMCITQYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV（配列番号3946）
E211Q	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVQQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3947）
M232R	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSRVLFSSPPV（配列番号3948）

【１００８】

ＧＳＳにリンクしているＰＲＮＰ(ＮＰ_０００３０２.１)(配列番号２９１)に対して相対的な変異部位は次のとおり報告されている:

【表６４－１】

突然変異	GSS プリオン病へ繋がる突然変異 PRNP のアミノ酸配列(BAGYNSZKY ET AL., 2018 の表2を参照)(PRNP NP_000302.1 の配列番号 291 と比べて)
P102L	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKLSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3949)
P105L	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKLKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3950)
A117V	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAVAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3951)
G131V	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLVSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3952)
V176G	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFGHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3953)
H187R	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQRTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV(配列番号3954)
	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号 487)
F198S	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENSTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3955)
D202N	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETNVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV(配列番号3956)
Q212P	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD

【表６４－２】

	EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEPMCITQYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV（配列番号3957）
Q217R	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITRYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV（配列番号3958）
M232T	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSTVLFSSPPV（配列番号3959）

【１００９】

プリオン病に対する可能な防護性の性質にリンクしているPRNP(NP_000302.1)(配列番号291)に対して相対的な変異部位は次のとおり:

【表６５】

突然変異	プリオン病に対する防護特質へ繋がる突然変異 PRNP のアミノ酸配列(BAGYNSZKY ET AL., 2018 の表4を参照)(PRNP NP_000302.1 の配列番号 291 と比べて)
G127S	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGSYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3960）
G127V	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGVYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3961）
M129V	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYVLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3962）
D167G	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMG EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3963）
D167N	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMN EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3964）
N171S	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSSQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYY QRGSSMVLFSSPPV（配列番号3965）

【表６６】

E219K	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYKRESQAY YQRGSSMVLFSSPPV（配列番号3966）
P238S	MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGG WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMK HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPNQVYYRPMD EYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCITQYERESQAY YQRGSSMVLFSSSPV（配列番号 3967）

【１０１０】

それゆえに、種々の態様において、多重フラッププライム編集は、プリオン病にリンクしているPRNPの変異を除去するかまたはプリオン病に対して防護性であると考慮されるPRNPの変異を組み入れるために用いられ得る。例えば、多重フラッププライム編集は、PRNPタンパク質のD178N、V180I、T188K、E196K、E196A、E200K、E200G、V203I、R208H、V210I、E211Q、I215V、またはM232R変異を除去または復元するために用いられ得る(NP_000302.1のPRNPに対して相対的)(配列番号291)。他の態様において、多重フラッププライム編集は、PRNPタンパク質のP102L、P105L、A117V、G131V、V176G、H187R、F198S、D202N、Q212P、Q217R、またはM232T変異を除去または復元するために用いられ得る(NP_000302.1のPRNPに対して相対的)(配列番号291)。プライム編集を用いてPRNPのかかる変異の存在を除去または修正することによって、プリオン病のリスクが縮減または消去され得る。

【１０１１】

他の態様において、多重フラッププライム編集は、1以上のプリオン病に対する防護性の効果にリンクしているPRNPの防護性変異を組み入れるために用いられ得る。例えば、多重フラッププライム編集は、PRNPのG127S、G127V、M129V、D167G、D167N、N171S、E219K、またはP238S防護性変異を組み入れるために用いられ得る(NP_000302.1のPRNPに対して相対的)(配列番号291)。なお他の態様において、防護性変異は、PRNPのG127、G127、M129、D167、D167、N171、E219、またはP238に組み入れされるいずれかの代替アミノ酸であり得る(NP_000302.1のPRNPに対して相対的)(配列番号291)。

【１０１２】

具体的な態様では、図27において例解され例5において論じられるとおり、多重フラッププライム編集はG127V防護性変異をPRNPに組み入れるために用いられ得る。

【１０１３】

別の態様では、プライム編集はE219K防護性変異をPRNPに組み入れるために用いられ得る。

【１０１４】

PRNPタンパク質および防護性変異部位は哺乳動物において保存されている。そのため、ヒト疾患を処置することに加えて、それは、プリオン病に対して免疫がある牛および羊を生成するか、またはさらにはプリオン病を患っている動物の野生集団を治癒させることを助けるためにもまた用いられ得る。プライム編集はヒト細胞における天然に存在する防護性アレルの～25％組み入れを達成するためにすでに用いられており、先のマウス実験は組み入れのこのレベルがほとんどのプリオン病に対する免疫を引き起こすために十分であるということを指示している。この方法は、ほとんどの細胞型においてかかる高い効率でこのアレルを組み入れるための第1のかつ可能性としては唯一の現行のやり方である。処置のための別の可能な戦略は、プライム編集または多重フラッププライム編集を用いて、早期停止コドンを遺伝子に組み入れることによってPRNPの発現を縮減または消去することである。

【１０１５】
PEgRNAデザインのための本明細書に記載の原理を用いて、適当なPEgRNAが、所望の防護性変異を組み入れるために、またはPRNPからプリオン病関連変異を除去するためにデザインされ得る。例えば、PEgRNAの下のリストは、G127V防護性アレルおよびE219K防護性アレルをヒトPRNPに、ならびにG127V防護性アレルを種々の動物のPRNPに組み入れるために用いられ得る。
【１０１６】
[10]医薬組成物
他の本開示の側面は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集システムの様々な構成要素のいずれも(例として、これらに限定されないが、napDNAbp、逆転写酵素、融合タンパク質(例として、napDNAbpsと逆転写酵素とを含む)、伸長されたガイドRNA、および融合タンパク質と伸長されたガイドRNAとを含む複合体、ならびに第2鎖ヘニックを入れる構成要素および5'内生DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼなどの、編集済産物形成への多重フラッププライム編集プロセスを推進するのに役立つ付属要素を包含する)含む医薬組成物に関する。
【１０１７】
用語「医薬組成物」は、本明細書に使用されるとき、医薬使用のために製剤化された組成物を指す。いくつかの態様において、医薬組成物はさらに、薬学的に許容し得る担体を含む。いくつかの態様において、医薬組成物は、追加の剤(例として、特定の送達、半減期の増大、または他の治療的化合物のための)を含む。
【１０１８】
ここで使用されるとき、用語「薬学的に許容し得る担体」は、液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤、製造補助剤(例として、潤滑剤、タルクマグネシウム、カルシウム、またはステアリン酸亜鉛もしくはステアリン酸)、あるいは身体のある部位(例として、送達部位)から別の部位(例として、器官、組織、もしくは身体部分)へ化合物を運搬または輸送することに関与する溶媒封入材料などの、薬学的に許容し得る材料、組成物、またはビヒクルを意味する。薬学的に許容し得る担体は、製剤の他の成分と相溶性があるが対象の組織に対しては傷害性がない(例として、生理学的に相溶性のある、滅菌された、生理学的なpH、等々)という意味で「許容し得る」ものである。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蝋などの、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。
【１０１９】
いくつかの態様において、医薬組成物は、対象への送達のために、例として、遺伝子編

集のために、製剤化される。本明細書に記載の医薬組成物を投与する好適なルートは、限定せずに、以下を包含する:局所、皮下、経皮、皮内、病巣内、関節内、腹腔内、膀胱内、経粘膜、歯肉、歯内(intradental)、蝸牛内、経鼓膜、器官内、硬膜外、髄腔内、筋肉内、静脈内、血管内、骨内、眼周囲、腫瘍内、脳内、および脳室内の投与。

【１０２０】

いくつかの態様において、本明細書に記載の医薬組成物は、罹患部位(例として、腫瘍部位)へ局部的に投与される。いくつかの態様において、本明細書に記載の医薬組成物は、注射によって、カテーテルを用いて、坐薬を用いて、あるいは移植片(多孔性材料、非多孔性材料、またはゼラチン材料(シラスティック膜などの膜もしくは繊維を包含する)の移植片)を用いて、対象へ投与される。

【１０２１】

他の態様において、本明細書に記載の医薬組成物は、制御放出系において送達される。一態様において、ポンプが使用されてもよい(例として、Langer,1990,Science 249:1527-1533;Sefton,1989,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201;Buchwald et al.,1980,Surgery 88:507;Saudek et al.,1989,N.Engl.J.Med.321:574を参照)。別の態様において、ポリマー材料が使用され得る。(例として、Langer and Wise eds.,CRC Press,Boca Raton,Fla.,1974);Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance(Smolen and Ball eds.,Wiley,New York,1984);Ranger and Peppas,1983,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61を参照。またLevy et al.,1985,Science 228:190;During et al.,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard et al.,1989,J.Neurosurg.71:105も参照。)他の制御放出系も、例えば、Langer(上記を参照)において考察されている。

【１０２２】

いくつかの態様において、医薬組成物は、対象(例として、ヒト)への静脈内投与または皮下投与に適した組成物として、定型的な手順に従って製剤化される。いくつかの態様において、注射による投与のための医薬組成物は、滅菌された等浸透圧の水性緩衝液中の溶液である。必要なら、医薬はまた、可溶化剤、および注射部位での疼痛を和らげるリグノカインなどの局所麻酔薬も包含し得る。一般に、成分は、個別にまたは一緒に混合されて、例えば、活性剤の分量を示したアンプルもしくは小袋(sachette)などの密閉容器中の凍結乾燥された(dry liophilized)粉末または水がない濃縮物として単位剤形で供給される。医薬が注入によって投与されることになっている場合、滅菌医薬グレードの水または生理食塩水を含有する注入瓶で分配され得る。医薬組成物が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、成分が投与に先立ち混合され得るように、提供され得る。

【１０２３】

全身投与のための医薬組成物は、液体、例として、滅菌された生理食塩水、乳酸リンガー溶液またはハンクス溶液であってもよい。加えて、医薬組成物は固体形態であって、使用に先立ち即時に再溶解または懸濁され得る。凍結乾燥された形態もまた企図される。

【１０２４】

医薬組成物は、非経口投与にも好適なリポソームもしくはマイクロ結晶などの脂質粒子またはベシクル内に含有され得る。粒子は、組成物がこれに含有される限り、単層(unilamellar)または多層(plurilamellar)などの、いずれの好適な構造でもあり得る。化合物は、膜融合(fusogenic)脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、低レベル(5～10mol%)のカチオン性脂質を含有し、かつポリエチレングリコール(PEG)コーティングによって安定化された「安定化プラスミド-脂質粒子」(SPLP)に封入され得る(Zhang Y.P.et al.,Gene Ther.1999,6:1438-47)。N-[1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチル-アンモニウムメチルスルファート、または「DOTAP」などの、正に帯電した脂質は、かかる粒子およびベシクルにとって具体的に好ましい。かかる脂質粒子の調製は周知である。例として、米国特許第4,880,635号;第4,906,477号;第4,911,928号;第4,917,951号;第4,920,016号;および第4,921,757号

を参照;これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０２５】

本明細書に記載の医薬組成物は、例えば、単位用量として投与またはパッケージされてもよい。用語「単位用量」は、本開示の医薬組成物に関して使用されるとき、まとまった投薬量として対象に好適な、物理的に不連続な単位を指し、予め決められた分量の活性材料を含有する各単位は、要求される希釈剤;すなわち、担体またはビヒクルを伴って所望の治療効果を産生するよう算出される。

【１０２６】

さらに、医薬組成物は、(a)本発明の化合物を凍結乾燥形態で含有する容器、および(b)注射のための薬学的に許容し得る希釈剤(例として、滅菌水)を含有する第2容器を含む医薬のキットとして提供され得る。薬学的に許容し得る希釈剤は、凍結乾燥された本発明の化合物の再構成または希釈のために使用され得る。任意に、かかる容器(単数または複数)に関連する通知は、医薬もしくは生物学的産物の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定される形態であり得、前記通知は、ヒト投与のための製造、使用、または販売の機関による承認を反映する。

【１０２７】

別の側面において、上に記載の疾患の処置に有用な材料を含有する製造物品が、包含される。いくつかの態様において、製造物品は、容器およびラベルを含む。好適な容器は、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、および試験管を包含する。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。いくつかの態様において、容器は、本明細書に記載の疾患を処置するのに有効であって滅菌アクセスポートを有していてもよい組成物をとどめておく。例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってもよい。組成物中の活性剤は本発明の化合物である。いくつかの態様において、容器上のまたはこれに関連したラベルは、組成物が、選んだ疾患を処置するのに使用されることを示す。製造物品はさらに、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、またはデキストロース溶液などの薬学的に許容し得る緩衝液を含む第2容器を含んでもよい。これはさらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用のための指示がある添付文書を包含する、商業的観点およびユーザーの観点から所望される他の材料も包含していてもよい。

【１０２８】

[11]キット、ベクター、細胞、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。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子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)、またはかかるガイドヌクレオチド配列(Cas9タンパク質またはプライム編集因子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。

【１０２９】

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いてもよい。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)(これらはキットととも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。

【１０３０】

いくつかの態様において、キットは任意に、提供される構成要素の使用のための指示および/または促進(promotion)を包含していてもよい。本明細書に使用されるとき、「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。指示はまた、ユーザーが明確に、指示がキットに関連するものであることを認識できるように(例えば、視聴覚に訴えるもの(例として、ビデオテープ、DVD、等々)、インターネット、および/またはウェブベースの連絡、等々)、形はどうあれ、いずれの口授または電子的指示も包含し得る。書面の指示は、医薬もしくは生物学的産物の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定される形態であってもよく、これは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も反映し得る。本明細書に使用されるとき、「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。加えて、キットは、本明細書に記載のとお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。

【１０３１】

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。

【１０３２】

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ともに、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、または当該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、他の構成要素、例えば、容器、細胞培地、塩、緩衝剤、試薬、シリンジ、針、殺菌剤を適用または除去するための生地(ガーゼなど)、使い捨て手袋、投与に先立ち剤を支持するためのもの等々も包含していてもよい。本開示のいくつかの側面は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集システム(例えば二重プライム編集または四重プライム編集システム)の様々な構成要素(例として、これらに限定されないが、napDNAbp、逆転写酵素、ポリメラーゼ、融合タンパク質(例として、napDNAbpと逆転写酵素(またはより広くは、ポリメラーゼ)とを含む)、伸長されたガイドRNA、および融合タンパク質と伸長されたガイドRNAとを含む複合体、ならびに第2鎖ヘニックを入れる構成要素(例として、第2鎖ヘニックを入れるgRNA)および5'内生DNAフラップ除去エンドヌクレアーゼなどの付属要素(編集済産物形成への多重フラッププライム編集プロセスを推進するのに役立つ)を包含する)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。いくつかの態様において、ヌクレオチド配列(単数または複数)は、多重フラップ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。

【１０３３】

本開示の他の側面は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子システムの様々な構成要素(例として、標的DNA配列を修飾することが可能な多重フラッププライム編集因子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以上の核酸構築物を含むキットを提供する。いくつかの態様において、ヌクレオチド配列は、多重フラッププライム編集因子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。

【１０３４】

本開示のいくつかの側面は、(a)逆転写酵素と融合したnapDNAbp(例として、Cas9ドメイン)をコードするヌクレオチド配列、および(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。

【１０３５】
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。本明細書に記載の方法は、Cas9タンパク質または多重フラッププライム編集因子を真核細胞(例として、ヒト細胞などの哺乳動物の細胞)中へ送達するのに使用される。いくつかの態様において、細胞は、in vitroにある(例として、培養された細胞)。いくつかの態様において、細胞は、in vivoにある(例として、ヒト対象などの対象中にある)。いくつかの態様において、細胞は、ex vivoにある(例として、対象から単離され、同じ対象へ戻すかまたは異なる対象へ投与されてもよい)。
【１０３６】
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。いくつかの態様において、rAAVベクターは、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞(例として、HEK293またはHEK 293T細胞)中へ送達される。いくつかの態様において、rAAVベクターは、例えば、多能性幹細胞(例として、ヒト人工(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もつ細胞を指す。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、内胚葉、中胚葉)の細胞特徴を生成するのが可能である。
【１０３７】
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、BR 293、BxPC3、C2C12、C3H-10T1/2、C6、C6/36、Cal-27、CGR8、CHO、CML T1、CMT、COR-L23、COR-L23/5010、COR-L23/CPR、COR-L23/R23、COS-7、COV-434、CT26、D17、DH82、DU145、DuCaP、E14Tg2a、EL4、EM2、EM3、EMT6/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。
【１０３８】
本開示のいくつかの側面は、本明細書に開示される構築物のいずれも含む細胞を提供する。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、トランスフェクトされる細胞は、対象から採られる。いくつかの態様において、細胞は、細胞株などの、対象から採られた細胞に由来する。組織培養のための多種多様の細胞株が当該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、HASMC、HEKn、HEKa、MiaPaCell、Panc1、PC-3、TF1、CTLL-2、C1R、Rat6、CV1、RPTE、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、A 172、A20、A253、A431、A-549、ALC、B16、B35、BCP-1細胞、BEAS-2B、bEnd.3、BHK-21、BR 293.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、CML T1、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-Mel 1-48、MC-38、MCF-7、MCF-10A、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、MDCK II、MDCK 11、MOR/0.2R、MONO-MAC 6、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/PNT 2、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。

【１０３９】

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)。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりのCRISPR系の構成要素で(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修飾された細胞は、修飾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。いくつかの態様において、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、またはかかる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。

【１０４０】

ベクター

本開示のいくつかの側面は、本明細書に記載の多重フラッププライム編集因子またはその構成要素(例として、分裂Cas9タンパク質もしくは分裂核酸塩基多重フラッププライム編集因子)の細胞中への送達のための、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編集因子が様々なウイルスベクター(例として、rAAV(～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。

【１０４１】

よって、一態様において、本開示は、分裂多重フラッププライム編集因子融合タンパク質またはそれらの分裂構成要素を送達するのか可能なベクターを企図する。いくつかの態様において、分裂Cas9タンパク質または分裂プライム編集因子を細胞(例として、哺乳動物の細胞、ヒト細胞)中へ送達するための組成物が提供される。いくつかの態様において、本開示の組成物は以下を含む:(i)そのC末端にてインテイン-Nと融合したCas9タンパク質またはプライム編集因子のN末端部分をコードする第1ヌクレオチド配列を含む第1組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子;および(ii)Cas9のタンパク質またはプライム編集因子のC末端部分のN末端と融合したインテイン-Cをコードする第2ヌクレオチド配列を含む第2組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)粒子。本開示のrAAV粒子は、ウイルスのカプシドタンパク質で包まれた(encapsidated)rAAVベクター(すなわち、rAAVの組換えゲノム)を含む。

【１０４２】

いくつかの態様において、rAAVベクターは以下を含む:(1)本明細書に記載のとおりのいずれの形態の分裂Cas9タンパク質もしくは分裂多重フラッププライム編集因子のN末端部分またはC末端部分をコードする第1あるいは第2ヌクレオチド配列を含む異種核酸領域、(2)異種核酸領域の発現を容易にさせる配列(例として、プロモーター)を含む1以上のヌクレオチド配列、および(3)異種核酸領域(任意に、発現を容易にさせる配列を含む1以上の核酸領域をもつ)の細胞ゲノム中への組み入れを容易にさせる配列を含む1以上の核酸領域。いくつかの態様において、組み入れを容易にさせるウイルスの配列は、逆方向末端反復(ITR)配列を含む。いくつかの態様において、分裂Cas9タンパク質もしくは分裂多重フラッププライム編集因子のN末端部分またはC末端部分をコードする第1あるいは第2ヌクレオチド配列は、ITR配列によって両側から挟まれている。いくつかの態様において、核酸ベクターはさらに、本明細書に記載のとおりのAAV Repタンパク質をコードする領域を含むが、前記領域は、ITRによって挟まれる領域内またはその領域外のいずれかに含有される。ITR配列は、いずれかのAAV血清型(例として、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10)に由来し得るか、または1より多くの血清型に由来し得る。いくつかの態様において、ITR配列は、AAV2またはAAV6に由来する。

【１０４３】

よって、いくつかの態様において、本明細書に開示のrAAV粒子は、少なくとも1のrAAV2粒子、rAAV6粒子、rAAV8粒子、rPHP.B粒子、rPHP.eB粒子、もしくはrAAV9粒子、またはそのバリアントを含む。具体的な態様において、開示されたrAAV粒子は、rPHP.B粒子、rPHP.eB粒子、rAAV9粒子である。

【１０４４】

ITR配列およびITR配列含有プラスミドは当該技術分野において知られており、市販されている(例として、Vector Biolabs,Philadelphia,PA;Cellbiolabs,San Diego,CA;Agilent Technologies,Santa Clara,Ca;およびAddgene,Cambridge,MAから利用可能な製品ならびにサービス;ならびに、骨格筋への遺伝子送達は治療用タンパク質の持続発現および全身送達をもたらす。Kessler PD,Podsakoff GM,Chen X,McQuiston SA,Colosi PC,Matelis LA,Kurtzman GJ,Byrne BJ.Proc Natl Acad Sci USA.1996 Nov 26;93(24):14082-7;およびCurtis A.Machida.Methods in Molecular Medicine™.Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols.10.1385/1-59259-304-6:201cHumana Press Inc.2003.Chapter 10.Targeted Integration by Adeno-Associated Virus.Matthew D.Weitzman,Samuel M.Young Jr.,Toni Cathomen and Richard Jude Samulski;米国特許第5,139,941号および第5,962,313号を参照(これらすべては参照により本明細書に組み込まれる))。

【１０４５】

いくつかの態様において、本開示のrAAVベクターは、異種核酸領域の発現を制御する

1以上の調節要素(例として、プロモーター、転写ターミネータ、および/または他の調節要素)を含む。いくつかの態様において、第1および/または第2ヌクレオチド配列は、1以上の(例として、1、2、3、4、5、またはそれ以上の)転写ターミネータへ作動可能に(operably)連結されている。本開示に従って使用されてもよい転写ターミネータの非限定例は、ウシ成長ホルモン遺伝子(bGH)、ヒト成長ホルモン遺伝子(hGH)、SV40、CW3、φ、またはそれらの組み合わせの転写ターミネータを包含する。数種の転写ターミネータの効率が試験され、分裂Cas9タンパク質または分裂多重フラッププライム編集因子の発現レベルにおけるそれら夫々の効果を決定した。いくつかの態様において、本開示に使用される転写ターミネータは、bGH転写ターミネータである。いくつかの態様において、rAAVベクターはさらに、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節要素(WPRE)を含む。ある態様において、WPREは、「W3」などのトランケートされたWPRE配列である。いくつかの態様において、WPREは、転写ターミネータの5'に挿入されている。かかる配列は、転写されたとき、発現、とりわけウイルスベクターからの発現を増強する3次構造を創出する。

【１０４６】

いくつかの態様において、本明細書に使用されるベクターは、PE融合タンパク質、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、真核細胞は、哺乳動物の細胞であってもよい。いくつかの態様において、真核細胞は、齧歯類の動物の細胞であってもよい。いくつかの態様において、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該技術分野において知られている。いくつかの態様において、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修飾されていてもよい。もう1つの他の態様において、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。

【１０４７】

いくつかの態様において、プライム編集因子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。いくつかの態様において、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、それらの機能的フラグメント、または上記のいずれの組み合わせを包含する。いくつかの態様において、プロモーターは、CMVプロモーターであってもよい。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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、Nphsl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。

【１０４８】

いくつかの態様において、プライム編集因子ベクター(例として、プライム編集因子融合タンパク質および/またはPEgRNA、および/または第2鎖ヘニックを入れる付属gRNAをコードするいずれのベクターも包含する)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いてもよい。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。いくつかの態様において、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。

【１０４９】

追加の態様において、プライム編集因子ベクター(例として、プライム編集因子融合タンパク質および/またはPEgRNA、および/または第2鎖ヘニックを入れる付属gRNAをコードするいずれのベクターも包含する)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いてもよい。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、エンドクリンプロモーター、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、Nphsl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。

【１０５０】

いくつかの態様において、PEgRNA(または多重フラップ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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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、HI、およびtRNAプロモーターを包含する。いくつかの態様において、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HIプロモーターへ作動可能に連結されていてもよい。いくつかの態様において、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、または異なっていてもよい。いくつかの態様において、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tracr RNA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。いくつかの態様において、crRNAをコードするヌクレオチド、およびtracr RNA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。いくつかの態様において、crRNAおよびtracr RNA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tracr RNA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tracr RNAは、転写されて単一分子ガイドRNAになってもよい。

【１０５１】

いくつかの態様において、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られていてもよい。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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産物の3'UTR内にあってもよい。いくつかの態様において、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ることもあり、これによってその3'UTRの長さが短縮される。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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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ることもある。

【１０５２】

多重フラッププライム編集因子ベクター系は、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、またはこれ以上を含んでいてもよい。いくつかの態様において、ベクター系は、PE融合タンパク質とPEgRNAとの両方をコードする1つの単一ベクターを含んでいてもよい。他の態様において、ベクター系は2つのベクターを含んでいてもよいが、ここで一方のベクターはPE融合タンパク質をコードし、他方がPEgRNAをコードする。追加の態様において、ベクター系は3つのベクターを含んでいてもよいが、ここで第3ベクターは、本明細書の方法に使用される、第2鎖ヘニックを入れるgRNAをコードする。

【１０５３】

いくつかの態様において、rAAV粒子を含む組成物(本明細書に企図されるいずれの形態)はさらに、薬学的に許容し得る担体を含む。いくつかの態様において、組成物は、ヒトまたは動物の対象への投与に適切な医薬ビヒクル中で製剤化される。

【１０５４】

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蝋などの、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。
【１０５５】
送達方法
いくつかの側面において、本発明は、本明細書の記載の多重フラッププライム編集因子の様々な構成要素をコードする1以上のポリヌクレオチド(本明細書に記載のとおりの1以上のベクターなど)、それらの1以上の転写産物、および/またはそれらから転写される1以上のタンパク質を宿主細胞へ送達することを含む方法を提供する。いくつかの側面において、本発明はさらに、かかる方法によって産生される細胞、およびかかる細胞を含むかまたはかかる細胞から産生される生物(動物、植物、もしくは真菌など)を提供する。いくつかの態様において、本明細書に記載のとおりの塩基編集因子は、ガイド配列と組み合わせて(任意にこれと複合化されて)、細胞へ送達される。
【１０５６】
例示の送達ストラテジーは、本明細書のどこかに記載されるが、ベクターベースのストラテジー、PEリボヌクレオタンパク質複合体の送達、およびmRNA方法によるPEの送達を包含する。
【１０５７】
いくつかの態様において、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)、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸抱合体、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの取り込みを増強する剤を包含する。
【１０５８】
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)、ビロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸抱合体、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの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好適なカチオン性脂質および中性脂質は、Feigner、WO91/17424;WO91/16024の脂質を包含する。送達は、細胞(例として、in vitro投与もしくはex vivo投与)、または標的組織(例として、in vivo投与)に対するものであり得る。送達は、RNP複合体の使用を通して達成されてもよい。
【１０５９】
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号を参照)。
【１０６０】
他の態様において、本明細書に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、塩基編集の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)へ繋がる。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 base editing through protei

n 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(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。

【１０６１】

細胞への核酸送達のための追加の方法は当業者に知られている。例えば、US 2003/0087817を参照(参照により本明細書に組み込まれる)。

【１０６２】

他の本開示の側面は、多重フラッププライム編集因子構築物を細胞中へ送達して、完全かつ機能的なプライム編集因子を細胞内に形成する方法を提供する。例えば、いくつかの態様において、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編集因子をコードするヌクレオチド配列、またはかかるヌクレオチド配列を含む核酸ベクターを含有するAAV粒子を含む組成物)と接触させられる。いくつかの態様において、接触させることは、かかる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編集因子のN末端部分、およびCas9タンパク質またはプライム編集因子の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編集因子を形成する。

【１０６３】

本明細書に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は解されるはずである。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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)。かかる形質導入は、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、分裂タンパク質を発現するプラスミドは、電気穿孔法、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取り入れ(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。

【１０６４】

ある態様において、本明細書に提供される組成物は、脂質および/またはポリマーを含む。ある態様において、脂質および/またはポリマーはカチオン性である。かかる脂質粒子の調製は周知である。例として、米国特許第4,880,635号;第4,906,477号;第4,911,928号;第4,917,951号;第4,920,016号;第4,921,757号;および第9,737,604号を参照(これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。

【１０６５】

ガイドRNA配列は長さが15～100ヌクレオチドであってもよく、標的ヌクレオチド配列に相補的な少なくとも10、少なくとも15、または少なくとも20の連続したヌクレオチドの配列を含む。ガイドRNAは、標的ヌクレオチド配列に相補的な15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または40の連続したヌクレオチドの配列を含んでいてもよい。ガイドRNAは、長さが15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドであってもよい。

【１０６６】

いくつかの態様において、標的ヌクレオチド配列は、ゲノム(例として、真核生物のゲ

ノム)中のDNA配列である。ある態様において、標的ヌクレオチド配列は、哺乳類の動物(例として、ヒト)ゲノム中にある。

【１０６７】

本開示の組成物は、例えば、単位用量として投与またはパッケージされてもよい。用語「単位用量」は、本開示の医薬組成物に関して使用されるとき、まとまった投薬量として対象に好適な、物理的に不連続な単位を指し、予め決められた分量の活性材料を含有する各単位は、要求される希釈剤;すなわち、担体またはビヒクルを伴って所望の治療効果を産生するよう算出される。

【１０６８】

疾患または障害の処置は、疾患の発症もしくは進行を遅延させるか、または疾患の重症度を低減させることを包含する。疾患を処置することは、根治した(curative)結果を必ずしも要さない。

【１０６９】

そこで使用されたとおり、疾患の発症を「遅延すること」は、疾患の進行を、先送りする(defer)、妨げる(hinder)、遅らせる(slow)、妨害する(retard)、留める(stabilize)、および/または延ばす(postpone)ことを意味する。この遅延は、病歴および/または処置される個体に応じて、時間の長さを変動させることでもあり得る。疾患の発症を「遅延」もしくは緩和する方法、または疾患の発病を遅延する方法は、この方法を使用しない場合と比較して、所定の時間枠での疾患の1以上の症状を発症する確率を低減するか、および/または所定の時間枠での症状の程度を低減する方法である。かかる比較は、典型的には、統計的に有意な結果を与えるのに充分数多の対象を使用する臨床研究に基づく。

【１０７０】

疾患の「発症」または「進行」は、最初の兆候および/またはその後の疾患の進行を意味する。疾患の発症は、当該技術分野において周知のとおりの標準の臨床技法を使用し検出可能であり、かつ査定され得る。しかしながら、発症はまた、検出不能なこともある進行も指す。本開示の目的上、発症または進行は、症状の生物学的な経過を指す。「発症」は、発生、再発、および発病を包含する。

【１０７１】

本明細書に使用されるとき、疾患の「発病」または「発生」は、最初の発病および/または再発を包含する。医学の当業者に知られている従来の方法は、処置されるべき疾患の型または疾患の部位に応じて、単離されたポリペプチドまたは医薬組成物を対象へ投与するのに使用され得る。

【１０７２】

さらなる詳細化はしないが、当業者は、上の記載に基づき、本開示を最大限に利用し得るものと思われる。したがって、以下の特定の態様は、単なる説明として解釈されるべきであって、いずれにしても本開示の残りを何ら限定するものではない。本明細書に引用されるすべての刊行物は、本明細書に言及される目的または主題のため、参照により組み込まれる。

【１０７３】

例

例1．ゲノム中に正確なヌクレオチド変化を組み入れるためのプライム編集(PE)

目的は、正確なゲノム編集の変革技術を開発すること、および哺乳動物ゲノム中の単一ヌクレオチドの変化の組み入れを生成することである。この技術は、研究者らに、事実上いずれの哺乳動物遺伝子においても、単一ヌクレオチドのバリエーションの効果を研究できるようにさせ、ヒト患者における病原性の点突然変異を修正するための治療的介入を潜在的に可能にさせるであろう。

【１０７４】

ゲノム編集のための、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)系の採用は、生命科学に革命をもたらした[1～3]。CRISPRを使用する遺伝子の断絶は今やルーチンとなっているが、単一ヌクレオチドの編集の正確な組み入れは、疾患が原因の多数

の突然変異を研究または修正するのに必要であるにも関わらず、大きな課題のままである。相同組み換え修復(HDR)は、かかる編集を達成させることは可能ではあるが、低い効率(しばしば＜5％)、ドナーDNA修復鋳型のための要件、および二本鎖DNA破壊(DSB)形成の有害効果に悩まされている。近年、Liu実験室が塩基編集を開発したが、これによってDSBのない効率的な単一ヌクレオチドの編集が達成される。塩基編集因子(BE)は、CRISPR系を塩基修飾デアミナーゼ酵素と組み合わせて、標的C・GまたはA・T塩基対を夫々A・TまたはG・Cへ変換する[4～6]。研究者らによって既に幅広く世界的に使用されているが(Addgeneによって流通された＞5,000 Liu実験室のBE構築物)、最新のBEは12塩基対の起こり得る変換のうちたった4つしかできず、小さい挿入または欠失を修正することはできない。その上、塩基編集の標的範囲は、標的塩基に隣接する非標的CまたはA塩基の編集(「バイスタンダー(bystander)編集」)によって、およびPAM配列が標的塩基から15±2bpに存在するという要件によって限定されている。したがって、これらの欠点を克服することは、ゲノム編集の基礎研究および治療用途を大幅に広げるであろう。

【１０７５】

ここで、塩基編集の利益の多く－つまり、二本鎖破壊の回避およびドナーDNA修復鋳型－を、その大きな欠点を克服しつつ与える、新しい高精度編集アプローチを開発することが提案される。この意欲的な目標を達成するため、標的にプライムされた逆転写(TPRT)を使用して、標的ゲノムの部位にて編集済DNA鎖を直接組み入れることを目的とする。本明細書に考察されるデザインにおいて、CRISPRガイドRNA(gRNA)は、結び付けられた逆転写酵素(RT)鋳型配列によって実行される、変異誘発DNA鎖合成をコードする鋳型を持つよう改変されるであろう。CRISPRヌクレアーゼ(Cas9)によってニックが入れられた標的部位DNAは、修飾gRNA上の鋳型配列の逆転写のためのプライマーとして働き、いずれの所望のヌクレオチド編集の直接的な組み込みを可能にするであろう。

【１０７６】

<u>セクション1</u>

変異誘発DNA鎖の、ガイドRNAを鋳型にした逆転写を確立する。先行研究によって、DNA切断の後であって複合体解離の前に、Cas9が非標的DNA鎖を放出して遊離の3'末端を晒すことが示された。このDNA鎖が、ポリメラーゼ酵素による伸長へアクセス可能であって、gRNAが、それらの5'末端または3'末端の伸長を通してDNA合成の鋳型として働くよう改変され得るものと仮定する。in vitroでの予備研究において、Cas9:gRNA結合複合体内のニックが入ったDNA鎖が、結合したgRNAを鋳型として使用する逆転写(transのRT酵素)を実際にプライムし得ることが確立された。次に、種々のgRNAリンカー、プライマー結合部位、および合成鋳型を、in vitroでの最適なデザイン規則を決定するために詳しく研究する。次いで、transで作用するかまたはCas9との融合体として作用する種々のRT酵素をin vitroで評価する。最終的に、細胞中の効率的な結合および切断活性を保持する改変gRNAデザインを同定する。これを目的とした実証実験の成功によって、細胞中の変異誘発鎖合成を遂行するための基盤が提供される。

【１０７７】

<u>セクション2</u>

ヒト細胞中のプライム編集を確立する。DNAプロセシングおよび修復機序に基づき、変異誘発DNA鎖(単鎖フラップ)は、標的ヌクレオチドの特異的かつ効率的な編集に向かうのに使用し得るものと仮定する。有望な予備研究において、このストラテジーの実現性を、変異誘発フラップを含有するモデルプラスミド基質での編集を実証することによって確立した。目的1と同時に、修復成果を、変異誘発フラップの長さ、配列組成、標的ヌクレオチドの同一性、および3'末端を系統的に変動させることによってさらに評価する。1～3ヌクレオチドの小さい挿入および欠失もまた試験する。目的1と並行して目的1から組み立て、融合タンパク質および非共有結合動員ストラテジーを包含するCas9-RT構造を評価する。Cas9-RT構造および伸長されたgRNAを、ヒトゲノム中の複数の標的部位での細胞の編集についてアッセイし、次いで高効率のために最適化する。成功した場合、この目的によって、基礎科学への適用のためのTPRTゲノム編集(すなわち、プライム編

集)が即時に確立される。

【１０７８】

セクション3

培養ヒト細胞中の病原性の突然変異の部位特異的編集を達成する。この技術の潜在的な普遍性は、目下BEによっては修正不能なトランスバージョン突然変異およびインデルの編集を可能にし得る。目的1および目的2の結果によって導かれて、鎌状赤血球病の創始者突然変異をベータグロビン中に(修正にはA・T→T・Aトランスバージョンを要する)および最も蔓延しているウィルソン病の突然変異をATP7B中に(修正にはG・C→T・Aトランスバージョンを要する)包含する培養ヒト細胞中の病原性のトランスバージョン突然変異を標的にする。嚢胞性線維症を引き起こすCFTR中の3ヌクレオチド△F508欠失を包含する、小さい挿入および欠失の突然変異の修正もまた調べる。成功した場合、これは、これらの重要なヒト疾患に対処する強力な治療的アプローチを開発するための基盤を据える。

【１０７９】

アプローチ

目標は、標的にされたゲノム部位にて点突然変異を直接組み入れるゲノム編集ストラテジーを開発することである。技術開発段階において、CRISPR/Cas系中へTPRT機能性を組み込む努力が、タンパク質およびRNA工学に注がれる。TPRTの各ステップの機能を慎重に探り、基礎から組み立てるのにIn vitroアッセイを使用する(目的1)。第2集中領域は、モデル基質と改変CRISPR/Cas系との組み合わせを使用して哺乳動物の細胞中の編集成果を評価する(目的2)。最終的に、適用段階は、他の方法によるゲノム編集では解決困難な突然変異を修正する技術を使用する(目的3)。

【１０８０】

一般的な編集デザインを図1A～1Bに示す。Cas9ニッカーゼは、PAM含有鎖(非標的鎖)へのDNA切断を制限する、HNHヌクレアーゼドメインに対する不活性化突然変異(Spy Cas9 H840AまたはN863A)を含有する。ガイドRNA(gRNA)を、逆転写のための鋳型を含有するよう改変する(デザインはスライド5上に詳細化)。示されるのはgRNAの5'伸長であるが、3'伸長でも実践できる。Cas9ニッカーゼを、C末端またはN末端のいずれかを通して、逆転写酵素(RT)酵素と融合させる。gRNA:Cas9-RT複合体は、着目するDNA領域を標的にし、非標的鎖に取って代わった後にRループを形成する。Cas9は非標的DNA鎖へニックを入れる。ニックが入った鎖の放出によって遊離の3'-OH末端が晒されるが、前記末端は、伸長されたgRNAを鋳型として使用する逆転写のプライム能がある。このDNA合成反応は、融合されたRT酵素によって遂行される。gRNA鋳型は、編集が標的にするヌクレオチドを除いて、元のDNA二重鎖と相同のDNA配列をコードする。逆転写産物は、所望の編集をコードする単鎖DNAフラップである。遊離の3'末端を含有するこのフラップは、隣接するDNA鎖と平衡化でき、5'フラップ種がもたらされる。後者の種は、FEN1(フラップエンドヌクレアーゼ1)の効率的な基質として働くものと仮定されており、前記酵素は、ラギング鎖DNA合成の最中に岡崎フラグメントから5'フラップを天然に切除し、長いパッチ(long-patch)の塩基切除修復の最中に生じる鎖置き換え合成の後に5'フラップを除去する。ニックが入ったDNAのライゲーションは、ミスマッチした塩基対を産生する。この中間体は、ミスマッチ修復(MMR)プロセスを介して、元の塩基対への復元または所望される編集済塩基対への変換のいずれかを経ることができる。代替的に、半保存的DNA複製によって、復元と編集との各1コピーが生み出され得る。

【１０８１】

例2－プライム編集:二本鎖DNA切断なしのヒト細胞における高度に汎用的なかつ精密な検索置換ゲノム編集

現行のゲノム編集法は、プログラム可能なヌクレアーゼを用いて二本鎖DNA切断の随伴する副産物と共に標的遺伝子を遮断、欠失、または挿入し得、塩基編集因子を用いて標的遺伝子座に4つのトランジション点変異を組み入れ組み入れ得る。しかしながら、小さい挿入、小さい欠失、および8つのトランスバージョン点変異は、集合的にはほとんどの

病原性の遺伝子バリアントを表すが、ほとんどの細胞型において、効率的にかつ余分な副産物なしに修正はされ得ない。標的部位を規定することおよび所望の編集をコードすることの両方をする操作されたプライム編集ガイドRNA(PEgRNA)によってプログラムされる操作された逆転写酵素に融合された触媒的に損なわれたCas9を用いて、新たな遺伝情報を規定されたDNA部位に直接的に書き込む高度に汎用的なかつ精密なゲノム編集法、プライム編集が本明細書に記載の。ヒト細胞の175よりも多大な別物の編集を行って、プライム編集が、標的化された挿入、欠失、全ての12の可能な型の点変異、およびそれらの組み合わせを、効率的に(未ソーティングの細胞において典型的には20-60%、最高で77%)かつ低い副産物(典型的には1-10%)によって、二本鎖切断またはドナーDNA鋳型を要求することなしになし得るということを確立した。プライム編集をヒト細胞において適用して、鎌状赤血球症(HBBのA・T→T・Aのトランスバージョンを要求する)およびテイ・サックス病(HEXAの4塩基欠失を要求する)の一次的な遺伝学的原因を修正し、両方のケースにおいて、最小限の副産物によって病原性のゲノムアレルを野生型に効率的に復帰させた。これらの病原性のHBBトランスバージョンおよびHEXA挿入変異を有するヒト細胞株を生出するために、プリオン病に対する耐性を付与するG127V変異をPRNPに組み入れるために(G・C→T・Aのトランスバージョンを要求する)、ならびにHis6タグ、FLAGエピトープタグ、および伸長されたLoxP部位をヒト細胞の標的遺伝子座に効率的に挿入するためにもまた、プライム編集を用いた。プライム編集は、HDRと比べて効率および産物純度の利点、ならびに塩基編集と比較して補完的な強さおよび弱さをオファーする。3つの別物の塩基対形成イベントを要求するその検索置換機序と整合して、プライム編集は公知のCas9オフターゲット部位においてCas9よりもかなりオフターゲットDNA改変をしにくい。プライム編集はゲノム編集の範囲および能力を実質的に拡張し、原理的には、公知の病原性のヒト遺伝子バリアントの～89%を修正し得る。

【１０８２】

実質的にいずれかの標的化された変化をいずれかの生細胞または生物のゲノムになす能力は、生命科学の長年の熱望である。ゲノム編集テクノロジーの急速な進歩にもかかわらず、疾患に関連する＞75,000の公知のヒト遺伝子バリアントの多数は[111]、ほとんどの治療学的に該当する細胞においては修正または組み入れされ得ない(図38A)。CRISPR-Cas9などのプログラム可能なヌクレアーゼは二本鎖DNA切断(DSB)を作り、これは挿入および欠失の混合物(インデル)を標的部位において誘導することによって遺伝子を遮断し得る[112～114]。ヌクレアーゼは、相同性非依存的プロセスによって、標的遺伝子を欠失[115,116]または外因的な遺伝子を挿入[117-119]するためにもまた用いられ得る。しかしながら、二本鎖DNA切断は、産物の複雑な混合物、転座[120]、およびp53活性化[121,122]を包含する望まれないアウトカムにもまた関連する。その上、病原性のアレルの大多数は、それらの非病原性のカウンターパートとは小さい挿入、欠失、または塩基置換が異なり、これらは修正するためにはかなりより精密な編集テクノロジーを要求する(図38A)。ヌクレアーゼによって誘導されるDSBによって刺激される相同組み換え修復(HDR)[123]は、種々の精密なDNA変化を組み入れるために広く用いられている。しかしながら、HDRは外因的なドナーDNA修復鋳型に依拠し、典型的にはDSBの末端結合修復からの余分なインデル副産物を生成し、ほとんどの治療学的に該当する細胞型では非効率的である(T細胞およびいくつかの幹細胞は重要な例外である)[124,125]。DSBによって媒介されるゲノム編集の効率および精度を増強することは有望な作業のフォーカスのままに留まっており[126～130]、これらの課題は代替的な精密ゲノム編集戦略の調査を要する。

【１０８３】

塩基編集は、哺乳動物を包含する広い種々の細胞型および生物において、DSBを要求することなしに、4つの型のトランジション変異(C→T、G→A、A→G、およびT→C)を効率的に組み入れまたは修正し得るが[128～131]、現行では、8つのトランスバージョン変異(C→A、C→G、G→C、G→T、A→C、A→T、T→A、およびT→G)のいずれか、例えば鎌状赤血球症の最も普通の原因(HBB E6V)を直接的に修正するために必要とされるT・A→A・Tの変異を達成し得ない[132]。加えて、標的の欠失、例えばテイ・サックス病

を引き起こす4塩基重複(HEXA 1278+TATC)の除去[133]、または標的化された挿入、例えば嚢胞性線維症の最も普通の原因(CFTR ΔF508)を直接的に修正するために要求される精密な3塩基挿入[134]を行うためのDSBフリーの方法は報告されていない。それゆえに、それらは集合的にほとんどの公知の病原性アレルを説明するにもかかわらず、標的化されたトランスバージョン点変異、挿入、および欠失は、ほとんどの細胞型においては効率的にかつ余分な副産物なしに組み入れまたは修正することが困難である(図38A)。

【１０８４】

二本鎖DNA切断またはドナーDNA鋳型を要求することなしに、ヒト細胞の標的遺伝子座における標的化された挿入、欠失、および12すべての可能な塩基から塩基の変換を媒介する新たな「検索置換」ゲノム編集テクノロジー、プライム編集の開発が本明細書に記載の。当初にPE1によって例示されたプライム編集因子は、プログラム可能なニッカーゼに融合された逆転写酵素とプライム編集の伸長されたガイドRNA(PEgRNA)とを用いて、遺伝情報をPEgRNA上の伸長から標的ゲノム遺伝子座に直接的にコピーする。第2世代プライム編集因子(PE2)は、操作された逆転写酵素を用いて最小限の(典型的には＜2％)インデル形成によって編集効率を実質的に増大させ、第3世代PE3システムは第2のガイドRNAを追加して非編集鎖にニッキングし、それによって非編集鎖の置き換えを好み、約1～10％インデル形成によってヒト細胞において典型的には約20～50％まで編集効率をさらに増大させる。PE3は最適化されたCas9ヌクレアーゼによって開始されるHDRと比較してずっと少数の副産物および高いかまたは類似の効率をオファーし、現行世代の塩基編集因子と比較して補完的な強さおよび弱さをオファーする。

【１０８５】

PE3をヒトHEK293T細胞のゲノム遺伝子座において適用して、HBB E6Vから野生型HBBへの効率的変換、HEXA 1278+TATCを野生型HEXAに復元するための挿入されたTATCの欠失、プリオン病に対する耐性を付与するG127V変異のPRNPへの組み入れ[135](G・C→T・Aのトランスバージョンを要求する)、ならびにHis6タグ(18bp)、FLAGエピトープタグ(24bp)、およびCreによって媒介される組み換えのための伸長されたLoxP部位(44bp)の標的化された挿入を達成した。プライム編集は3つの他のヒト細胞株および有糸分裂後初代マウス皮質ニューロンにおいてもまた様々な効率で首尾良かった。当初のニックおよび編集の位置付けの間の距離の高い度合のフレキシビリティーを原因として、プライム編集はCas9のPAM要件によって実質的に制約されず、原理的にはゲノム遺伝子座の大多数を標的化し得る。蓋然的には、生産的なプライム編集が生起するための3つの別物のDNA塩基対形成イベントという要件を原因として、オフターゲットプライム編集は公知のCas9オフターゲット遺伝子座におけるオフターゲットCas9編集よりもかなり稀である。精密な標的化された挿入、欠失、および全ての12の可能なクラスの点変異を広い種々のゲノム遺伝子座においてDSBまたはドナーDNA鋳型の必要なしに可能化することによって、プライム編集は多くの遺伝子バリアントの研究および修正を進歩させるポテンシャルを有する。

【１０８６】

結果

伸長されたガイドRNAからの情報を標的DNA遺伝子座上に移入するための戦略

Cas9は、標的DNA部位にハイブリダイズするスペーサー配列を含有するガイドRNAを用いてDNAを標的化する[112～114,136,137]。狙いは、天然のCRISPRシステムのようにDNA標的を規定するように[138,139]、また、標的遺伝子座の対応するDNAヌクレオチドを置き換える新たな遺伝情報を含有するように両方でガイドRNAを操作することであった。伸長されたガイドRNAから規定されたDNA部位への遺伝情報の直接的移入、次に元の編集されないDNAの置き換えは、原理的には、DSBまたはドナーDNA鋳型への依存性なしに、標的化されたDNA配列変化を生細胞に組み入れる一般的手段を提供し得る。この直接的情報移入を達成するために、狙いは、3'-ヒドロキシル基を暴露するように標的部位においてニッキングされたゲノムDNAを用いて、操作されたガイドRNA(これ以降では、プライム編集ガイドRNAまたはPEgRNAと言われる)の伸長から直接的に標的部位

への遺伝情報の逆転写をプライムすることであった(図38A)。

【１０８７】

いくつかの天然の可動遺伝因子によって用いられる機序に似るニッキングおよび逆転写のこれらの当初のステップは[140]、2つの冗長性の一本鎖DNAフラップを1つの鎖上に有する分岐した中間体をもたらす:編集されないDNA配列を含有する5'フラップおよびPEgRNAからコピーされた編集された配列を含有する3'フラップである(図38B)。首尾良い編集を達成するためには、編集された3'フラップが編集されない5'フラップを置き換えるようにして、この分岐した中間体は分解されなければならない。編集された3'フラップは編集されない鎖とより少数の塩基対を作り得るので、編集されない鎖との5'フラップのハイブリダイゼーションは熱力学的に有利であることが蓋然的であるが、5'フラップはFEN1などの構造特異的エンドヌクレアーゼの好ましい基質である[141]。これは、ラギング鎖DNA合成およびロングパッチ塩基除去修復の間に生成された5'フラップを切り出す。選好的5'フラップ切除および3'フラップライゲーションは、編集されたDNA鎖の組み込みを駆動し得、1つの編集された鎖および1つの編集されない鎖を含有するヘテロ二重鎖DNAを生出するということが推論された(図38B)。

【１０８８】

編集の永久的な組み入れは、編集された鎖から相補的なDNA鎖に情報をコピーする様式で、2つのDNA鎖間のミスマッチを分解する続くDNA修復から発生し得る(図38C)。DNA塩基編集の効率を最大化するために開発された類似の戦略に基づいて[131～133]、二本鎖切断形成を最小化するために当初のニックの部位から十分遠くにおける非編集DNA鎖へニックを入れることは、非編集鎖を選好的に置き換えるようにDNA修復を偏らせ得るということが想定された。

【１０８９】

in vitroおよび酵母細胞におけるプライム編集ステップの検証

Cas9のRuvCヌクレアーゼドメインによるPAM含有DNA鎖の切断後に、この鎖のPAM遠位フラグメントは、さもなければ安定なCas9:sgRNA:DNA複合体から解離し得る[143]。この解放された鎖の3'端は、DNA重合をプライムするために十分にアクセス可能であり得るという仮説が立てられた。ガイドRNA操作作業[144～146]およびCas9:sgRNA:DNA複合体の結晶構造[147～149]は、sgRNAの5'および3'末端がCas9:sgRNA活性を廃止することなしに伸長され得るということを示唆する。2つの重大な構成要素を包含するようにsgRNAを伸長することによって、PEgRNAをデザインした:ニッキングされたDNA鎖の3'端がPEgRNAにハイブリダイズすることを許すプライマー結合部位(PBS)、およびニッキングされたDNA鎖の3'端がポリメラーゼによってRNA鋳型上を伸長されるとゲノムDNA部位に直接的にコピーされるであろう所望の編集を含有する逆転写酵素(RT)鋳型である(図38C)。

【１０９０】

これらの仮説を、精製されたS.pyogenes Cas9タンパク質を用いてin vitroで試験した。sgRNAをどちらかの末端においてPBS配列(5～6ヌクレオチド、nt)およびRT鋳型(7～22nt)によって伸長することによって、一連のPEgRNA候補を構築した。5'伸長されたPEgRNAは標的DNAに対するCas9結合を導くということ、ならびに5'伸長されたPEgRNAおよび3'伸長されたPEgRNA両方がin vitroのCas9によって媒介される標的ニッキングと哺乳類細胞におけるDNA切断活性とを支持するということが確認された(図44A～44C)。これらの候補PEgRNAデザインを、予めニックが入った5'-Cy5標識dsDNA基質、触媒的に不活性型Cas9(dCas9)、およびモロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)逆転写酵素の市販のバリアントを用いて試験した(図44D)。全ての構成要素が存在するときには、ゲル移動度によって、蛍光標識されたDNA鎖からより長いDNA産物への効率的な変換が観察され、RT鋳型に沿った逆転写と整合した(図38D、図44D～44E)。所望の長さの産物が、5'伸長または3'伸長されたPEgRNAどちらかで形成された(図38D～38E)。dCas9の省略は、PEgRNA情報移入なしに、DNA鋳型上の逆転写酵素によって媒介されるDNA重合に由来するニックトランスレーション産物に至った(図38D)。PE

gRNAが従来のsgRNAによって置き換えられたときには、DNA重合産物は観察されず、PEgRNAのPBSおよびRT鋳型構成要素の必要性を確認した(図38D)。これらの結果は、Cas9によって媒介されるDNA融解が一本鎖Rループを暴露し、これは、ニッキングされる場合には、5'伸長または3'伸長されたPEgRNAどちらかからの逆転写をプライムすることに有能であるということを実証している。

【１０９１】

次に、ニッキングされないdsDNA基質を、専らPAM含有鎖へニックを入れるCas9ニッカーゼ(H840A変異体)によって試験した[112]。これらの反応では、ことによると損なわれたCas9ニッカーゼ活性を原因として、5'伸長されたPEgRNAは逆転写産物を非効率的に生成した(図44F)。しかしながら、3'伸長されたPEgRNAはロバストなCas9ニッキングおよび効率的な逆転写を可能化した(図38E)。原理的には逆転写がPEgRNAの残りのどこかで終結するポテンシャルにもかかわらず、3'伸長されたPEgRNAの使用は単一の明らかな産物のみを生成した。Cas9ニッカーゼ、RT、および3'伸長されたPEgRNAによる反応の産物のDNA配列決定は、完全なRT鋳型配列がDNA基質へと逆転写されるということを明らかにした(図44G)。これらの実験は、3'伸長されたPEgRNAが、Cas9ニッカーゼ活性を導く能力を保持しながら、新たなDNA鎖の逆転写の鋳型となり得るということを確立した。

【１０９２】

in vitroのPEgRNAによってプログラムされる逆転写によって生ずる3'フラップの真核細胞DNA修復アウトカムを評価するために、レポータープラスミド基質に対するin vitroのPEgRNA、Cas9ニッカーゼ、およびRTを用いるDNAニッキングおよび逆転写を行い、次いで、反応産物を酵母(S.cerevisiae)細胞に形質転換した(図45A)。心強いことに、プラスミドが、未成熟停止コドンを修正するT・A→A・Tのトランスバージョンをコードする3'伸長されたPEgRNAによってin vitroで編集されたときには、酵母形質転換体の37％がGFPおよびmCherryタンパク質両方を発現した(図38F、図45C)。図38Eおよび図44Fの結果と整合して、5'伸長されたPEgRNAによってin vitroで実行された編集反応は、3'伸長されたPEgRNAによるものよりも少数のGFPおよびmCherry二重陽性コロニー(9％)を生んだ(図38Fおよび図45D)。生産的な編集は、フレームシフト変異を修正するために1ヌクレオチドを挿入するか(15％の二重陽性形質転換体)または1ヌクレオチドを欠失する(29％の二重陽性形質転換体)3'伸長されたPEgRNAを用いてもまた観察された(図38Fおよび図45E～45F)。二重陽性の酵母コロニーから回復した編集されたプラスミドのDNA配列決定は、コードされるトランスバージョン編集が所望の配列位置において生起するということを確認した(図45G)。これらの結果は、真核細胞のDNA修復がプライム編集から発生する3'DNAフラップを分解して、トランスバージョン、挿入、および欠失を包含する精密なDNA編集を組み込み得るということを実証している。

【１０９３】

プライム編集因子1(PE1)のデザイン

in vitroのおよび酵母の結果によって促されて、哺乳類細胞のゲノムDNAを編集することができる最小の数の構成要素によるプライム編集システムを、開発のために探求した。3'伸長されたPEgRNA(これ以降では単純にPEgRNAと言われる。図39A)とフレキシブルなリンカーを介した逆転写酵素へのCas9 H840Aの直接的融合体とは、機能的な2構成要素プライム編集システムを構成し得るという仮説が立てられた。HEK293T(不死化ヒト胎児腎臓)細胞を、Cas9 H840Aニッカーゼのどちらかの末端への野生型M-MLV逆転写酵素の融合体をコードする1つのプラスミドと、PEgRNAをコードする第2のプラスミドとによってトランスフェクションした。当初の試みはHEK3標的遺伝子座における検出可能なT・A→A・Tの変換には至らなかった。

【１０９４】

しかしながら、8-15塩基へのPEgRNA上のPBSの伸長は(図39A)、HEK3標的部位における検出可能なT・A→A・Tの編集に至った(図39B)。RTがCas9ニッカーゼのC末端に融合されたプライム編集因子構築物(8～15ntの範囲であるPBS長さによって、3.7％

の最大のT・A→A・Tの変換)では、N末端RT-Cas9ニッカーゼ融合体(1.3%の最大のT・A→A・Tの変換)と比較して高い効率であった(図39B;別様に規定されない限り、本願の全ての哺乳類細胞データは、セレクションまたはソーティングなしの処置された細胞集団全体の値を報告している)。これらの結果は、トランスで供給されるM-MLV RTの市販のバリアントを用いてin vitroで要求されるものと比較して、Cas9に融合された野生型M-MLV RTがヒト細胞におけるゲノム編集のための長いPBS配列を要求するということを示唆する。Cas9 H840Aニッカーゼの C末端に融合されたこの第1世代野生型M-MLV逆転写酵素はPE1として指定された。

【１０９５】

PEgRNAによって規定される4つの追加のゲノム標的部位におけるトランスバージョン点変異を精密に導入するPE1の能力(図39C)を試験した。HEK3遺伝子座における編集と類似に、これらのゲノム部位における効率はPBS長さに依存的であり、最大の編集効率は0.7-5.5%の範囲であった(図39C)。PE1からのインデルは低く、各部位の編集効率を最大化する条件下において、5つの部位について平均で0.2±0.1%であった(図46A)。PE1は、HEK3遺伝子座において、1ヌクレオチド欠失(4.0%効率)、1ヌクレオチド挿入(9.7%)、および3ヌクレオチド挿入(17%)によって例示される標的化された挿入および欠失を組み入れる能力があった(図39C)。これらの結果は、二本鎖DNA切断またはDNA鋳型を要求することなしに、標的化されたトランスバージョン、挿入、および欠失を直接的に組み入れるPE1の能力を確立する。

【１０９６】

プライム編集因子2(PE2)のデザイン

【１０９７】

PE1は種々の編集をHEK293T細胞のいくつかの遺伝子座において組み入れ組み入れ得るが、編集効率は一般的に低かった(典型的には≦5%)(図39C)。PE1の逆転写酵素を操作することは、プライム編集複合体の固有の立体配座制約内でDNA合成の効率を改善し得、より高いゲノム編集収量をもたらすという仮説が立てられた。酵素熱安定性[150,151]、処理能力[150]、およびDNA:RNAヘテロ二重鎖基質親和性[152]を増大させる、ならびにRNaseH活性を不活性化する[153]M-MLV RT変異が先に報告されている。種々の逆転写酵素変異を含有する19のPE1バリアントを構築して、それらのプライム編集効率をヒト細胞において評価した。

【１０９８】

第1に、上昇した温度における逆転写を支持するそれらの能力について先に実験室進化から新興した一連のM-MLV RTバリアント[150]を取り調べた。これ以降ではM3と言われるM-MLV RT上へのこれらのアミノ酸置換の3つ(D200N、L603W、およびT330P)の順次の導入は、PE1のものと比較して、HEK293T細胞の5つのゲノム遺伝子座におけるトランスバージョンおよび挿入編集効率の6.8倍の平均の増大に至った(図47A-47S)。

【１０９９】

次に、M3との組み合わせで、鋳型:PBS複合体に対する結合、酵素処理能力、および熱安定性を増強することが先に示された追加の逆転写酵素変異[152]を試験した。分析された14の追加の変異体のうち、M3変異に加えてT306KおよびW313F置換を有するバリアントは、ヒト細胞の5つのゲノム部位における6つのトランスバージョンまたは挿入編集について、M3と比較して編集効率を追加の1.3倍～3.0倍改善した(図47A～47S)。PE1アーキテクチャに組み込まれたM-MLV逆転写酵素のこの五重変異体(Cas9 H840A-M-MLV RT(D200N L603W T330P T306K W313F))はこれ以降ではPE2と言われる。

【１１００】

PE2は、1ヌクレオチドトランスバージョン、挿入、および欠失変異をPE1よりも実質的に高い効率で組み入れし(図39C)、より短いPBS PEgRNA配列と適合性であり(図39C)、一過性のゲノムDNA:PBS複合体に生産的に係合する増強された能力と整合する。平均で、PE2はPE1と比べてプライム編集点変異効率の1.6～5.1倍の改善に至り(図39C)、いくつかのケースでは、編集収量を最高で46倍まで劇的に改善した(図47Fおよび図4

7I)。PE2は標的化された挿入および欠失をPE1よりも効率的に成し遂げ、PE1によってこの挿入を組み入れる効率と比べて15倍の改善の4.5％の効率でHEK3遺伝子座における24bp FLAGエピトープタグの標的化された挿入を達成し(図47D)、PE1のものよりも2.1倍高い8.6％の効率でHEK3の1bp欠失を媒介した(図39C)。これらの結果はPE2をPE1よりも効率的なプライム編集因子として確立する。

【１１０１】

PEgRNA特色の最適化

【１１０２】

PEgRNAアーキテクチャおよびプライム編集効率の間の関係性をHEK293T細胞の5つのゲノム遺伝子座においてPE2によって体系的に探査した(図39C)。一般的に、より低いGC含量を有するプライム部位はより長いPBS配列を要求するが(EMX1およびRNF2。夫々40％および30％GC含量をニックの上流の最初の10ntに含有する)、より多大なGC含量を有するものはより短いPBS配列によるプライム編集を支持し(HEK4およびFANCF。夫々80％および60％GC含量をニックの上流の最初の10ntに含有する)(図39C)、PEgRNA PBSに対するニッキングされたDNA鎖のハイブリダイゼーションのためのエネルギー的要件と整合する。PBS長さまたはGC含量レベルはプライム編集効率を厳格には予測せず、DNAプライマーまたはPEgRNA伸長の二次構造などの他の因子もまた編集活性に影響を及ぼし得る。典型的な標的配列では～13ntのPBS長さから出発し、配列が、～40～60％GC含量から逸脱する場合には異なるPBS長さを調査することが推奨される。必要なときには、最適なPBS配列は経験的に決定されるはずである。

【１１０３】

次に、PEgRNAのRT鋳型部分の性能決定要因を研究した。長さが10～20ntの範囲であるRT鋳型を有するPEgRNAを、5つのゲノム標的部位においてPE2を用いて(図39D)および31ntほども長いより長いRT鋳型によって3つのゲノム部位において(図48A～48C)体系的に評価した。PBS長さのように、RT鋳型長さもまたプライム編集効率を最大化するために変えられ得るが、一般的には、多くのRT鋳型長さ≧10nt長はより効率的なプライム編集を支持する(図39D)。いくつかの標的部位はより高い編集効率(FANCF、EMX1)を達成するためにはより長いRT鋳型(＞15nt)を好み、他の遺伝子座は短いRT鋳型(HEK3、HEK4)を好むので(図39D)、～10～16ntから出発して、PEgRNAを最適化するときには、短いおよび長いRT鋳型両方が試験されるということが推奨される。

【１１０４】

重要なことに、sgRNA骨格の末端ヘアピンに隣接するヌクレオチドとしてCを置くRT鋳型は、一般的に、類似の長さのRT鋳型を有する他のPEgRNAと比較して低い編集効率をもたらした(図48A～48C)。Cas9に結合したsgRNAの構造に基づいて[148,149]、標準的なsgRNAの3'伸長の最初のヌクレオチドとしてのCの存在は、Cas9のTyr 1356とのパイスタックおよびsgRNA A68との非標準的な塩基対をネイティブに形成するヌクレオチドG81との対形成によって、sgRNA骨格折り畳みを遮断し得るということが推量された。多くのRT鋳型長さはプライム編集を支持するので、3'伸長の最初の塩基(RT鋳型の最後の逆転写される塩基)がCではないPEgRNAを選ぶことが推奨される。

【１１０５】

プライム編集因子3システム(PE3およびPE3b)のデザイン

【１１０６】

PE2は遺伝情報をPEgRNAから標的遺伝子座にPE1よりも効率的に移入し得るが、細胞が1つの編集された鎖および1つの編集されない鎖によって生出されるもたらされるヘテロ二重鎖DNAを分解する様式は、編集が耐久性であるかどうかを決定する。シトシンまたはアデニン脱アミノ化の当初の産物は1つの編集されたおよび1つの非編集の鎖を含有するヘテロ二重鎖DNAであるので、塩基編集の先の開発は類似の課題に当面した。塩基編集の効率を増大させるために、Cas9 D10Aニッカーゼを用いてニックを非編集鎖に導入し、編集された鎖を鋳型として用いるDNA修復をその鎖へと導いた[129,130,142]。この原理を有効利用してプライム編集効率を増強するために、細胞による非編集鎖の選好

的置き換えを誘導するために、すでにPE2に存在するCas9 H840Aニッカーゼと単純なsgRNAとを用いて非編集鎖へニックを入れる類似の戦略(図40A)を試験した。編集されたDNA鎖もまたプライム編集を開始するためにニッキングされたので、種々のsgRNAによってプログラムされるニックの位置付けを非編集鎖について試験して、インデルに至る二本鎖DNA切断の生産を最小化した。

【１１０７】

PAMの5'または3'どちらかのPEgRNAによって誘導されるニックの部位から14～116塩基に位置付けられるニックを誘導するsgRNAをスクリーニングすることによって、このPE3戦略を最初にHEK293T細胞の5つのゲノム部位において試験した。試験された5つの部位のうち4つでは、非編集鎖へニックを入れることは、インデルフリーなプライム編集産物の量を、PE2システムと比較して1.5～4.2倍、55％ほども高くまで増大させた(図40B)。最適なニッキング位置はゲノム部位に依存して変わったが、PEgRNAによって誘導されるニックからおよそ40～90bpのPAMの3'に位置取るニックは(図40Bの正の距離)、一般的には、プライム編集効率の好ましい増大(平均で41％である)を余分なインデル形成なしに生じた(試験された5つの部位の夫々において、最も高い編集効率をもたらすsgRNAでは6.8％の平均インデル)(図40B)。予想されるとおり、いくつかの部位では、PEgRNAによって誘導されるニックの40bp以内に非編集鎖ニックを置くことは、最高で22％のインデル形成の大きい増大に至った(図40B)。おそらくは、近接する両鎖に一緒へニックを入れることからの二本鎖切断の形成を原因とする。しかしながら、他の部位では、PEgRNAによって誘導されるニックから14bpほども近接するニッキングは5％インデルのみを生じ(図40B)、遺伝子座依存性因子が近位の二元的なニックから二本鎖DNA切断への変換をコントロールするということを示唆した。1つの試験された部位(HEK4)では、PEgRNAによって誘導されるニックから距離＞70bpに置かれるときでさえも、相補鎖ニックは利益を提供しないかまたは編集効率を越えるインデルレベル(最高で26％)に至るかどちらかであり、その部位の編集された鎖が細胞によってニッキングされるかまたは非効率的にライゲーションされる普通でない傾向と整合した。PEgRNAによって媒介されるニックからおよそ50bpの非編集鎖ニックから出発することと、インデル度数が許容されるレベルを超過する場合には代替的なニック位置付けを試験することとが推奨される。

【１１０８】

どのようにして相補鎖ニッキングがプライム編集効率を改善するのかについてのこのモデルは(図40A)、編集された鎖のフラップ分解後にのみ非編集鎖へニックを入れることが、同時的なニックの存在を最小化し得、引き続きインデルを形成する二本鎖切断の度数を減少させるということを予測した。非編集鎖ニッキングの時間的コントロールを達成するために、元のアレルではなく編集された鎖にマッチするスペーサー配列を有するsgRNAをデザインした。これ以降ではPE3bと言われるこの戦略を用いて、スペーサーおよび編集されないアレルの間のミスマッチは、PAM鎖上の編集イベントが生起する後までは、sgRNAによるニッキングを好まないはずである。このPE3bアプローチを、HEK293T細胞の3つのゲノム部位における5つの異なる編集によって試験し、アウトカムをPE2およびPE3システムによって達成されるものと比較した。全てのケースで、PE3bは、PE3と比較して総体的な編集効率のいずれかの明白な減少なしに、PE3と比較して実質的に低いレベルのインデルに関連した(3.5～30倍。平均で12倍低いインデルまたは0.85％である)(図40C)。よって、編集が第2のプロトスペーサー上に在ったときには、PE3bシステムは、PE2と比較して編集効率を多くの場合にはPE3のものと類似のレベルまでなお改善しながら、インデルを減少させ得た(図40C)。

【１１０９】

一緒になって、これらの知見は、PE3システム(Cas9ニッカーゼ-最適化逆転写酵素+PEgRNA+sgRNA)が編集効率をPE2と比較して～3倍改善するということを確立した(図40B～40C)。PE3の追加のニッキング活性から、予想されるとおり、PE3はPE2よりも広い範囲のインデルによって随伴された。PE3の使用はプライム編集効率を優先すると

きに推奨される。インデルの最小化が重大であるときには、PE2は～10倍低いインデル度数をオファーする。組み入れされた編集を認識して非編集鎖へニックを入れるsgRNAを用いることが可能であるときには、PE3bシステムはインデル形成を多大に縮減しながらPE3様の編集レベルを達成し得る。

【１１１０】

PE3によるプライム編集の標的化範囲および汎用性を実証するために、HEK3標的部位の+1～+8位置(PEgRNAによって誘導されるニックの3'の最初の塩基を位置+1としてカウントする)における全ての可能な1ヌクレオチド置換の組み入れを、PE3と10ヌクレオチドRT鋳型を有するPEgRNAとを用いて(図41A)調査した。集合的に、これらの24の別物の編集は全ての4つのトランジション変異および全ての8つのトランスバージョン変異をカバーし、平均で33±7.9%である(14%および48%の間の範囲である)編集効率(インデルを含有しない)で、平均で7.5±1.8%のインデルによって進む。

【１１１１】

重要なことに、長距離RT鋳型もまたPE3による効率的なプライム編集を生じさせ得る。例えば、PE3を34nt RT鋳型と共に用いて、点変異をHEK3遺伝子座の位置+12、+14、+17、+20、+23、+24、+26、+30、および+33(PEgRNAによって誘導されるニックから12～33塩基)に組み入れし、平均で36±8.7%の効率および8.6±2.0%のインデルを有した(図41B)。他の遺伝子座における+10位置以降の編集は試みなかったが、3つの代替的な部位における他のRT鋳型≧30ntもまた効率的編集を支持する(図48A～C)。長いRT鋳型の実行可能性は、当初のニック部位から何ダースものヌクレオチドについて効率的なプライム編集を可能化した。どちらかのDNA鎖上のNGG PAMは、効率的なプライム編集を支持する編集およびPAMの間の最大距離よりもずっと少ない平均で～8bp毎に生起するので、他の精密ゲノム編集法とは対照的に、プライム編集は近傍のPAM配列の利用可能性によって実質的に制約されない[125,142,154]。RNA二次構造とプライム編集効率との間の推定される関係性から、ロングレンジ編集のためのPEgRNAをデザインするときには、種々の長さおよび必要な場合には配列組成(例えば、同義コドン)のRT鋳型を試験して編集効率を最適化することが賢明である。

【１１１２】

トランジションおよびトランスバージョン点変異を導入するためのPE3システムの範囲および限定をさらに試験するために、全ての12の可能な方の点変異をカバーする72の追加の編集を6つの追加のゲノム標的部位(図41C～41H)について試験した。総体的に、インデルフリーな編集効率は平均で25±14%であり、インデル形成は平均で8.3±7.5%であった。PEgRNA RT鋳型はPAM配列を包含したので、プライム編集はPAM配列の変化を誘導し得た。これらのケースでは、より高い編集効率(平均で39±9.7%である)およびより低いインデル生成(平均で5.0±2.9%である)が観察された(図41A～41K。位置+5または+6における点変異)。PAM編集の効率のこの増大およびインデル形成の減少は、Cas9ニッカーゼが相補鎖の修復に先行して編集された鎖に再結合およびニッキングすることの不能から発生し得る。プライム編集は編集効率の明らかな損失なしに組み合わせ編集を支持するので、可能なときには、他の所望の変化に加えてPAMを編集することが推奨される。

【１１１３】

次に、14の標的化された小さい挿入および14の標的化された小さい欠失を、7つのゲノム部位において、PE3を用いて(図41I)行った。標的化された1bp挿入は32±9.8%の平均効率で進み、3bp挿入は39±16%の平均効率で組み入れされた。標的化された1bpおよび3bp欠失もまた効率的であり、夫々29±14%および32±11%の平均収量で進んだ。インデル生成(標的化された挿入または欠失以外)は平均で6.8±5.4%であった。位置+1および+6の間に導入された挿入および欠失はPAMの位置または構造を変改するので、PAMを編集する点変異と類似に、Cas9ニッカーゼが相補鎖の修復に先行して編集された鎖に再結合およびニッキングすることの不能を原因として、この範囲の挿入および欠失編集は典型的にはより効率的であるということが推量された。

【１１１４】
PE3は、HEK3部位における5bp～80bpのより大きい精密な欠失を媒介するその能力についてもまた試験された(図41J)。13nt PBSと夫々29、24、または19bpの相同性を標的遺伝子座に対して含有するRT鋳型とを用いたときには、非常に高い編集効率(52～78%)が5、10、および15bp欠失について観察された。26nt RT鋳型を用いることは、72±4.2%の効率で25bpというより大きい欠失を支持し、20nt RT鋳型は52±3.8%の効率で80bp欠失を可能化した。これらの標的化された欠失は平均で11±4.8%であるインデル度数によって随伴された(図41J)。
【１１１５】
最後に、3つのゲノム部位における挿入および欠失、挿入および点変異、欠失および点変異、または2つの点変異からなる同じ標的遺伝子座における複数の編集の12の組み合わせを媒介するPE3の能力を試験した。これらの組み合わせ編集は非常に効率的であり、6.4%のインデルによって平均で55%の標的編集であり(図41K)、精密な挿入、欠失、および点変異の組み合わせを個々の標的部位において高い効率および低いインデル度数でなすプライム編集の能力を実証した。
【１１１６】
一緒になって、図41A-41Kの例は7つのヒトゲノム遺伝子座における156の別物のトランジション、トランスバージョン、挿入、欠失、および組み合わせ編集を表す。これらの知見はプライム編集の汎用性、精度、および標的化フレキシビリティーを確立する。
【１１１７】
塩基編集と比較したプライム編集
【１１１８】
現行世代のシチジン塩基編集因子(CBE)およびアデニン塩基編集因子(ABE)は、C・G→T・Aのトランジション変異およびA・T→G・Cのトランジション変異を高い効率および低いインデルで組み入れ組み入れ得る[129,130,142]。塩基編集の適用は、欲されないバイスタンダー編集を生じさせる塩基編集活性窓(典型的には～5bpの幅)上の複数のシチジンまたはアデニン塩基の存在によって[129,130,142,155]、または標的ヌクレオチドからおよそ15±2ntに位置取るPAMの不在によって[142,156]限定され得る。プライム編集は、バイスタンダー編集なしの、または好適に位置取ったPAMの欠如が標的ヌクレオチドをCBEまたはABE活性窓上に好ましく位置取らせることを不可能にするときの、トランジション変異の精密な組み入れにとって特に有用であり得るということが予期された。
【１１１９】
プライム編集およびシトシン塩基編集を、複数の標的シチジンを標準的な塩基編集窓(プロトスペーサー位置4～8。PAMを位置21～23としてカウントする)上に含有する3つのゲノム遺伝子座を編集することによって比較した。ニッカーゼ活性なしの(BE2max)もしくはニッカーゼ活性ありの(BE4max)最適化されたCBE[157]を用いるか、または類縁のPE2およびPE3プライム編集システムを用いた。3つの部位の塩基編集窓上の合計9つの標的シトシンのうち、BE4maxは、PE3よりも2.2倍高い平均のC・G→T・Aの総変換を塩基編集窓の中心の塩基(プロトスペーサー位置5～7。図42A)について生んだ。同様に、非ニッキングBE2maxはこれらの良く位置取った塩基においてPE2に平均で1.4倍優った(図42A)。しかしながら、塩基編集窓の中心以外のシトシンについて、PE3はBE4maxに2.7倍優り、PE2はBE2maxに2.0倍優った(PE3の40±17%対BE4maxの15±18%、およびPE2の22±11%対BE2maxの11±13%の平均編集)。総体的に、PE2のインデル度数は非常に低く(平均で0.86±0.47%であった)、PE3では、BE4maxのものに類似かまたはそれよりも控えめに高かった(BE4max範囲:2.5%～14%;PE3範囲:2.5%～21%)(図42B)。
【１１２０】
精密なC・G→T・Aの編集の組み入れ(いずれかのバイスタンダー編集なし)について塩基編集の効率をプライム編集と比較したときには、プライム編集の効率は上の部位において塩基編集のものを多大に超過した。これらは、ほとんどのゲノムDNA部位のように、

複数のシトシンを～5bp塩基編集窓上に含有する(図42C)。シトシンをプロトスペーサー位置C5、C6、およびC7に含有するEMX1などのこれらの部位では、BE4maxは、バイスタンダー編集なしの単一の標的塩基対変換のみを含有する少数の産物を生成した。対照的に、この部位におけるプライム編集は、C・G→T・Aの編集をいずれかの位置または位置の組み合わせ(C5、C6、C7、C5+C6、C6+C7、C5+C7、またはC5+C6+C7)において選択的に組み入れるために用いられ得た(図42C)。全ての精密な1塩基または2塩基編集(つまり、いずれかの他の近傍塩基を改変しない編集)は、PE3またはPE2では夫々BE4maxまたはBE2よりもかなり効率的であったが、3塩基のC・G→T・Aの編集はBE4maxでより効率的であり(図42C)、活性窓上の全ての標的塩基を編集する塩基編集因子の傾向を反映した。一緒にすると、これらの結果は、シトシン塩基編集因子は最適に位置取った標的塩基においてPE2またはPE3よりも高いレベルの編集をもたらし得るが、プライム編集は非最適に位置取った標的塩基において塩基編集に優り得、複数の編集可能な塩基ではかなり高い精度で編集し得るということを実証している。

【1121】

最適化された非ニッキングABE(Cas9ニッカーゼの代わりにdCas9によるABEmax[152]。これ以降ではABEdmaxと言われる)対PE2によるおよび最適化されたニッキングアデニン塩基編集因子ABEmax対PE3によるA・T→G・Cの編集を2つのゲノム遺伝子座において比較した。2つの標的アデニンを塩基編集窓上に含有する部位(HEK3)では、ABEはA5の変換についてPE2またはPE3よりも効率的であったが、PE3はABEmax編集窓の縁部に在るA8の変換についてより効率的であった(図42D)。単一のアデニンのみが変換される精密編集の効率を比較するときには、PE3はA5およびA8両方においてABEmaxに優った(図42E)。総体的には、ABEはプライム編集因子よりもずっと少数のインデルをHEK3において生じた(ABEdmaxの0.19±0.02%対PE2の1.5±0.46%、およびABEmaxの0.53±0.16%対PE3の11±2.3%、図42F)。単一のAのみが塩基編集窓上に存在するFANCFにおいては、ABE2およびABEmaxは全標的塩基対変換がそれらのプライム編集カウンターパートに1.8～2.9倍優り、塩基編集およびプライム編集両方からの実質的に全ての編集された産物は精密な編集のみを含有した(図42D～42E)。HEK3部位のように、ABEはFANCF部位においてずっと少数のインデルを生じた(図42F)。

【1122】

集合的に、これらの結果は、標的化されたトランジション変異を作ることについて、塩基編集およびプライム編集が補完的な強さおよび弱さをオファーするということを指示する。単一の標的ヌクレオチドが塩基編集窓上に存在するケースでは、またはバイスタンダー編集が許容されるときには、現行の塩基編集因子は典型的にはプライム編集因子よりも効率的であり、少数のインデルをもたらす。複数のシトシンまたはアデニンが存在しかつバイスタンダー編集が望ましくないときには、または標的塩基が利用可能なPAMに対して相対的に塩基編集にとって不良に位置取るときには、プライム編集因子は実質的な利点をオファーする。

【1123】

オフターゲットプライム編集

【1124】

生産的な編集をもたらすためには、プライム編集は、Cas9ドメインが結合するための相補的な標的遺伝子座:PEgRNAスペーサー、PEgRNAによってプライムされる逆転写が開始するための標的遺伝子座:PEgRNA PBS相補性、およびフラップ分解のための標的遺伝子座:逆転写酵素産物相補性を要求する。これらの3つの別物のDNAハイブリダイゼーション要件は、他のゲノム編集法のものと比較してオフターゲットプライム編集を最小化し得るという仮説が立てられた。この可能性を試験するために、HEK293T細胞を、PE3またはPE2と4つのオンターゲットゲノム遺伝子座を標的化するようにデザインされた合計16のPEgRNAとによって、Cas9と同じプロトスペーサーを標的化する4つの対応するsgRNAとによって、またはCas9と同じ16のPEgRNAとによって処置した。夫々が、Cas9および対応するオンターゲットsgRNAがHEK293T細胞において実質的なオフターゲ

ットDNA改変を引き起こすことが公知である少なくとも4つの良く特徴付けられたオフターゲット部位を有するので[118,159]、これらの4つの標的遺伝子座が選ばれた。処置後に、各オンターゲットスペーサーにとっての4つのオンターゲット遺伝子座および上位4つの公知のCas9オフターゲット部位を合計16のオフターゲット部位について配列決定した(表1)。

【１１２５】

先の研究と整合して[118]、Cas9および4つの標的sgRNAは、先に報告されたオフターゲット遺伝子座の全ての16を改変した(図42G)。HEK3標的遺伝子座について、4つのオフターゲット部位におけるCas9オフターゲット改変効率は平均で16％であった。Cas9およびHEK4を標的化するsgRNAは、4つの試験された公知のオフターゲット部位の平均で60％の改変をもたらした。同様に、EMX1およびFANCFのオフターゲット部位は、Cas9:sgRNAによって夫々48％および4.3％の平均度数で改変された(図42G)。sgRNAと比較して、PEgRNAはCas9ヌクレアーゼと共にオンターゲット部位を平均して類似の(1～1.5倍低い)効率で改変するが、PEgRNAはCas9ヌクレアーゼと共にオフターゲット部位をsgRNAよりも～4倍低い平均効率で改変するということが注意された。

【１１２６】

著しくは、これらの4つの標的スペーサーを含有する同じ16の試験されたPEgRNAによるPE3またはPE2はかなり低いオフターゲット編集をもたらした(図42H)。Cas9+sgRNAによるオフターゲット編集を経過することが公知の16の部位のうち、PE3+PEgRNAまたはPE2+PEgRNAは16のオフターゲット部位のうち3つのみにおいて検出可能なオフターゲットプライム編集をもたらし、16のうち1つのみがオフターゲット編集効率≧1％を示した(図42H)。これらの16の公知のCas9オフターゲット部位におけるHEK3、HEK4、EMX1、およびFANCFを標的化するPEgRNAの平均オフターゲットプライム編集は、夫々＜0.1％、＜2.2±5.2％、＜0.1％、および＜0.13±0.11％であった(図42H)。注意すべきことに、Cas9+PEgRNA1が97％効率で編集するHEK4オフターゲット3部位では、PE2+PEgRNA1は同じスペーサー配列を共有するにもかかわらず0.7％オフターゲット編集のみをもたらし、Cas9編集と比較してプライム編集に要求される2つの追加のDNAハイブリダイゼーションイベントが、どのようにしてオフターゲット編集を多大に縮減し得るのかということを実証する。一緒にすると、これらの結果は、PE3およびPEgRNAが、Cas9および同じプロトスペーサーを標的化するsgRNAよりもヒト細胞におけるかなり低いオフターゲットDNA編集を誘導するということを示唆する。

【１１２７】

3'伸長されたPEgRNAの逆転写は原理的にはガイドRNA骨格上へと進み得る。もたらされる3'フラップが、編集されないDNA鎖とのその3'端における相補性の欠如にもかかわらず、標的遺伝子座に組み込まれる場合には、アウトカムはPEgRNA骨格ヌクレオチドの挿入であり、これはインデル度数に寄与する。我々は、HEK293T細胞の4つの遺伝子座における66のPE3によって媒介される編集実験からの配列決定データを分析し、いずれかの数のPEgRNA骨格ヌクレオチドの平均で1.7±1.5％の全挿入である低い度数で、PEgRNA骨格挿入を観察した(図56A～56D)。Cas9ドメイン結合を原因とする逆転写酵素にとってのガイドRNA骨格のアクセス不可能性と、PEgRNA骨格逆転写からもたらされる3'フラップのミスマッチの3'端のフラップ分解の間の細胞性の切除とは、PEgRNA骨格ヌクレオチドを組み込む産物を最小化するということが推量される。かかるイベントは稀であるが、PEgRNA骨格組み込みを最小化するPEgRNAまたはプライム編集因子タンパク質を操作するための将来の作業は、インデル度数をさらに減少させ得る。

【１１２８】

デアミナーゼはいくつかの塩基編集因子ではCas9非依存的様式で作用し得、低レベルだが広範囲のオフターゲットDNA編集を(ABEではなく)第1世代CBEにおいて[160～162]、ならびにオフターゲットRNA編集を第1世代CBEおよびABEにおいてもたらすが[163～165]、操作されたデアミナーゼによるより新たなCBEおよびABEバリアントはCas9非依存的なオフターゲットDNAおよびRNA編集を多大に縮減する[163～165]。プライム編集

因子はデアミナーゼなどの塩基修飾酵素を欠き、よって、Cas9非依存的様式でDNAまたはRNA塩基を改変する内在的能力を有さない。

【１１２９】

原理的には、プライム編集因子の逆転写酵素ドメインは適切にプライムされたRNAまたはDNA鋳型を細胞内でプロセシングし得るが、レトロトランスポゾン、例えばLINE-1ファミリー[166]、内生レトロウイルス[167,168]、およびヒトテロメラーゼのものは全て、活性な内生ヒト逆転写酵素を提供するということが注意された。ヒト細胞におけるそれらの天然の存在は、逆転写酵素活性それ自体は実質的に毒性ではないということを示唆する。実に、dCas9、Cas9 H840Aニッカーゼ、または逆転写酵素を不活性化するR110S+K103L変異を有するPE2(PE2-dRT)を発現する対照のものと比較して、HEK293T細胞生存性のPE3依存的な違いは観察されなかった[169](図49A～49B)。

【１１３０】

上のデータおよび分析にもかかわらず、オフターゲットプライム編集をバイアスがないゲノムワイドな様式で評価するために、およびプライム編集因子またはプライム編集中間体の逆転写酵素バリアントが細胞に影響し得る程度を特徴付けるために、追加の研究が必要とされる。

【１１３１】

ヒト細胞の病原性のトランスバージョン、挿入、および欠失変異をプライム編集する

【１１３２】

遺伝子疾患を引き起こすトランスバージョン、小さい挿入、および小さい欠失変異をヒト細胞に直接的に組み入れまたは修正するPE3の能力を試験した。鎌状赤血球症は最も普通にはHBBのA・T→T・Aのトランスバージョン変異によって引き起こされ、ベータグロビンのGlu6→Valの変異をもたらす。Cas9ヌクレアーゼとHDRのためのドナーDNA鋳型とによるex vivoの造血幹細胞の処置、次に編集された細胞の濃縮、移植、および定着は、鎌状赤血球症の処置のための有望な可能性ある戦略である[170]。しかしながら、このアプローチは、正しく編集されたHBBアレルに加えてなお多くのインデル含有副産物を生成する[170～171]。塩基編集因子は一般的にはずっと少数のインデルを生ずるが、それらはHBBの正常配列を直接的に復元するために必要とされるT・A→A・Tのトランスバージョン変異を現行ではなし得ない。

【１１３３】

PE3を用いて、44％の効率および4.8％インデルでHEK293T細胞にHBB E6V変異を組み入れした(図43A)。PE3処置された細胞の混合物から、我々はHBB E6Vアレルについてホモ接合(三倍体)である6つのHEK293T細胞株を単離し(図53A～53D)、プライム編集が病原性の変異を有するヒト細胞株を生成する能力を実証した。HBB E6Vアレルを野生型HBBに修正するために、我々は、HBB E6V変異を野生型HBBに直接的に復帰させるようにプログラムされたPE3およびPEgRNAによってホモ接合HBB E6V HEK293T細胞を処置した。合計14のPEgRNAデザインを試験した。3日後に、DNA配列決定は、全ての14のPEgRNAがPE3と組み合わせられたときに、HBB E6Vから野生型HBBへの効率的な修正と(インデルなしの≧26％野生型HBB)平均で2.8±0.70％であるインデルレベルとを与えるということを明らかにした(図50A)。最も良好なPEgRNAはHBB E6Vから野生型への52％修正を2.4％インデルでもたらした(図43A)。PEgRNAによって認識されるPAMを改変するサイレントな変異の導入は、編集効率および産物純度を1.4％インデルによる58％修正まで控えめに改善した(図43A)。これらの結果は、プライム編集がヒト細胞株の病原性のトランスバージョン点変異を高い効率および最小限の副産物によって組み入れおよび修正し得るということを確立する。

【１１３４】

テイ・サックス病は最も多くの場合にはHEXA遺伝子上への4bp挿入(HEXA 1278+TATC)によって引き起こされる[136]。PE3を用いて、この4bp挿入をHEK293T細胞に31％の効率および0.8％のインデルで組み入れし(図43B)、HEXA 1278+TATCアレルについてホモ接合である2つのHEK293T細胞株を単離した(図53A-53D)。これらの細胞

を用いて、43のPEgRNAおよび3つのニッキングsgRNAを、PE3またはPE3bシステムによって、HEXAの病原性の挿入の修正について試験した(図50B)。野生型アレルへの完璧な復帰によるか、またはPAMを遮断しかつサイレントな変異を組み入れるシフトした4bp欠失によるかどちらかである。試験された43のPEgRNAのうち19は≧20%編集をもたらした。PE3またはPE3bおよび最も良好なPEgRNAによる野生型HEXAへの完璧な修正は類似の平均効率で進んだが(PE3の30%対PE3bの33%)、PE3bシステムは5.3倍少数のインデル産物によって随伴された(PE3の1.7%対PE3bの0.32%)(図43Bおよび図50B)。これらの知見は、哺乳類細胞の病原性のアレルを効率的にかつ最小の副産物によって組み入れまたは修正する精密な小さい挿入および欠失をなすプライム編集の能力を実証する。

【1135】

最後に、ヒトプリオンタンパク質(PrP)をコードする遺伝子PRNP上への防護性のSNPの組み入れを試験した。PrPミスフォールディングは進行性のかつ致死的な神経変性プリオン病を引き起こし、これはPRNP遺伝子上の受け継がれた優性変異によってまたはミスフォールディングしたPrPに対する暴露によって自発的に発生し得る[172]。天然に存在するPRNP G127V変異体アレルはヒト[138]およびマウス[173]においてプリオン病に対する耐性を付与する。PE3を用いてG127VをHEK293T細胞のヒトPRNPアレルに組み入れした。これはG・C→T・Aのトランスバージョンを要求する。4つのPEgRNAおよび3つのニッキングsgRNAをPE3システムによって評価した。最も有効なPE3およびPEgRNAに対する3日の暴露後に、DNA配列決定は、G127V変異を組み入れる53±11%の効率と1.7±0.7%のインデルレベルとを明らかにした(図43C)。一緒にすると、これらの結果は、プライム編集がヒト細胞においてトランスバージョン、挿入、または欠失変異を組み入れまたは修正する能力を確立する。これらは、疾患に対する耐性を効率的にかつ最小の副産物によって引き起こすかまたは付与する。

【1136】

種々のヒト細胞株および初代マウスニューロンのプライム編集

【1137】

次に、プライム編集を、3つの追加のヒト細胞株の内生部位を編集するその能力について試験した。K562(白血病骨髄)細胞では、PE3を用いて、HEK3、EMX1、およびFANCF部位のトランスバージョン編集、ならびにHEK3における6xHisタグの18bp挿入を行った。15-30%の平均編集効率がこれらの4つのPE3によって媒介される編集の夫々について観察され、インデルは平均で0.85～2.2%であった(図43A)。U2OS(骨肉腫)細胞では、HEK3およびFANCFのトランスバージョン変異、ならびにHEK3への3bp挿入および6xHisタグ挿入を、インデル形成を10～76倍超過する7.9～22%の編集効率によって組み入れした(図43A)。最後に、HeLa(子宮頸がん)細胞では、HEK3への3bp挿入を12%平均効率および1.3%インデルによって行った(図43A)。集合的に、これらのデータはHEK293T細胞以外の複数の細胞株がプライム編集を支持するということを指示しているが、編集効率は細胞型によって変わり、一般的にはHEK293T細胞よりも効率的ではない。編集:インデル比は、全ての試験されたヒト細胞株において高いままに留まった。

【1138】

プライム編集が有糸分裂後の終末分化した初代細胞において可能であるかどうかを決定するために、E18.5マウスから収穫された初代皮質ニューロンを二元的な分裂PE3レンチウイルス送達システムによって形質導入した。これにおいては、分裂インテインスプライシング[203]が、夫々が別個のウイルスから送達されるN末端およびC末端半分からPE2タンパク質を再構成する。編集を有糸分裂後ニューロンに制限するために、成熟したニューロンに高度に特異的であるヒトシナプシンプロモーター[204]を用いて両方のPE2タンパク質構成要素の発現を駆動した。GFPを自己切断P2Aペプチド[205]を介してPE2のN末端半分に融合した。ニューロンからの核を二元的なウイルス形質導入の2週後に単離し、直接的に配列決定するかまたは配列決定前にGFP発現についてソーティングした。ソーティングされた核において0.58±0.14%の平均インデルによってDNMT1遺伝子座におけ

るトランスバージョンを組み入れるための7.1±1.2%の平均プライム編集(図43D)が観察された。同じ分裂インテインの二元的レンチウイルスシステムにおけるCas9ヌクレアーゼは、ソーティングされた皮質ニューロン核において31±5.5%のインデルをもたらした(図43D)。これらのデータは、有糸分裂後の終末分化した初代細胞がプライム編集を支持し得るということを指示し、それゆえにプライム編集が細胞複製を要求しないということを確立する。

【1139】

Cas9によって開始されるHDRと比較したプライム編集

【1140】

PE3の性能を、HDRを支持する有糸分裂細胞株において[128]、最適化されたCas9によって開始されるHDR[128,125]のものと比較した。HEK293T、HeLa、K562、およびU2OS細胞を、種々のトランスバージョンおよび挿入編集を組み入れるようにデザインされたCas9ヌクレアーゼ、sgRNA、およびssDNAドナーオリゴヌクレオチド鋳型によって処置した(図43E-43Gおよび図51A-51F)。Cas9によって開始されるHDRは、全てのケースにおいて、二本鎖切断を引き起こす処置から予想されるとおりずっと高いレベルの副産物(支配的にはインデル)によって、所望の編集を首尾良く組み入れした。PE3をHEK293T細胞に用いて、HBB E6V組み入れおよび修正は夫々42%および58%の平均編集効率で2.6%および1.4%の平均インデルによって進んだ(図43Eおよび図43G)。対照的に、Cas9ヌクレアーゼおよびssDNA鋳型による同じ編集は、5.2%および6.7%の平均編集効率を79%および51%の平均インデル度数によってもたらした(図43Eおよび図43G)。類似に、PE3はPRNP G127Vを53%の効率および1.7%インデルで組み入れしたが、Cas9によって開始されるHDRはこの変異を6.9%の効率および53%インデルで組み入れした(図43Eおよび図43G)。それゆえに、HBB E6V組み入れ、HBB E6V修正、およびPRNP G127V組み入れの編集:インデルの比は、Cas9によって開始されるHDRよりもPE3では平均で270倍高かった。

【1141】

HEK293T以外のヒト細胞株におけるPE3およびHDRの間の比較は、より低いPE3編集効率でだが、類似の結果を示した。例えば、K562細胞では、HEK3上へのPE3によって媒介される3bp挿入は、Cas9によって開始されるHDRの17%編集および72%インデルと比較して25%の効率および2.8%のインデル、PE3を好む40倍の編集:インデル率という利点によって進んだ(図43F～43G)。U2OS細胞では、PE3はこの3bp挿入を22%効率および2.2%インデルで行い、Cas9によって開始されるHDRは、74%のインデルによる15%の編集、49倍低い編集:インデル比をもたらした(図43F-43G)。HeLa細胞では、Cas9によって開始されるHDRの3.0%の編集および69%のインデルに対して、PE3はこの挿入を12%の効率および1.3%のインデル、210倍の編集:インデル比の違いによってなした(図43F～43G)。集合的に、これらのデータは、HDRが、典型的には、試験された4つの細胞株においてPE3よりも低いかまたは類似の編集効率およびずっと高いインデルをもたらすということを指示した(図51A～51F)。

【1142】

考察および将来の方向

【1143】

1ヌクレオチド精度でDNA配列を挿入する能力は、特に有能なプライム編集能力である。例えば、PE3を用いて、HEK293T細胞のHEK3遺伝子座にHis_6タグ(18bp、65%平均効率)、FLAGエピトープタグ(24bp、18%平均効率)、およびCreリコンビナーゼのネイティブな基質である伸長されたLoxP部位(44bp、23%平均効率)を精密に挿入した。平均インデルはこれらの例では3.0%および5.9%の間の範囲であった(図43H)。多くのバイオテクノロジー、合成生物学、および治療学的適用が、新たなDNA配列を生細胞の目当ての標的部位に効率的にかつ精密に導入する能力から発生することが想定される。

【1144】

集合的に、本明細書に記載のプライム編集実験は、最高で44bpの18の挿入、最高で8

0bpの22の欠失、77のトランスバージョンを包含する113の点変異、および18の組み合わせ編集を、ヒトおよびマウスゲノムの12の内生遺伝子座において、PAMのスタートの3bp上流から29bp下流の範囲である位置付けにおいて、あからさまな二本鎖DNA切断を作ることなしに組み入れした。これらの結果はプライム編集を著しく汎用的なゲノム編集法として確立する。ClinVarの挿入、欠失、インデル、および重複の圧倒的多数(85-99%)は≦30bpであるので(図52A～52D)、原理的には、プライム編集はClinVarの75,122の現行で公知の病原性のヒト遺伝子バリアントの最高で～89%を修正し得(図38Aのトランジション、トランスバージョン、挿入、欠失、インデル、および重複)、コピー数獲得または損失によって引き起こされる疾患を改善する追加のポテンシャルを有する。

【1145】

重要なことに、いずれかの所望の編集について、プライム編集のフレキシビリティーは、PEgRNAによって誘導されるニックの位置付け、sgRNAによって誘導される第2のニックの位置付け、PBS長さ、RT鋳型長さ、およびどの鎖が最初に編集されるかの多くの可能な選択肢を、本願において鋭意実証されるとおりオファーする。他の精密ゲノム編集法で典型的に利用可能なより限定されたオプション[125,142,154]とは対照をなすこのフレキシビリティーは、編集効率、産物純度、DNA特異性、または他のパラメータが、所与の適用の必要に適するように最適化されることを許す。図50A～50Bに示されているとおりであり、これらにおいては、ある範囲のプライム編集戦略をカバーする14および43のPEgRNAを試験することが、夫々病原性のHBBおよびHEXAアレルの修正を最適化した。

【1146】

かなりの追加の研究が、プライム編集をさらに理解および改善するために必要とされる。プライム編集因子システムの追加の改変が、有糸分裂後細胞などの他の細胞型を包含するようにそれらの適合性を拡張するために要求され得る。プライム編集をウイルス的および非ウイルス的なin vitroおよびin vivo送達戦略とインターフェース接続することが、遺伝子疾患の研究および処置を包含する広い範囲の適用を可能化するプライム編集のポテンシャルを十分に調査するために必要とされる。しかしながら、二本鎖切断またはHDRを要求することなしに、哺乳類細胞のゲノム上の高度に精密な標的化されたトランジション、トランスバージョン、小さい挿入、および小さい欠失を可能化することによって、プライム編集は、ゲノム編集の範囲を実質的に拡張する新たな「検索置換」能力を提供する。

【1147】

<u>方法</u>

一般的な方法

【1148】

別様に記されない限り、DNA増幅はPhusion U Green Multiplex PCRマスターミックス(ThermoFisher Scientific)またはQ5 Hot Start高忠実性2×マスターミックス(New England BioLabs)を用いるPCRによって行った。Cy5標識DNAオリゴヌクレオチド、dCas9タンパク質、およびCas9 H840Aタンパク質を包含するDNAオリゴヌクレオチドはIntegrated DNA Technologiesから得た。酵母レポータープラスミドは先に記載されたプラスミド[64]に由来し、Gibsonアセンブリ法によってクローニングされた。本願において用いられる全ての哺乳類編集因子プラスミドは先に記載されているとおりUSERクローニング法を用いてアセンブリされた[175]。sgRNAを発現するプラスミドは、BsmBI消化されたアクセプターベクター上へのアニーリングされたオリゴヌクレオチドのライゲーションによって構築した。PEgRNAを発現するプラスミドはGibsonアセンブリまたはゴールデンゲートアセンブリによってカスタムのアクセプタープラスミドを用いて構築した(補足の「ゴールデンゲートアセンブリ」概説を見よ)。本願において用いられるsgRNAおよびPEgRNA構築物の配列は表2A-2Cおよび表3A-3Rに列記されている。哺乳類細胞実験のための全てのベクターはPlasmid Plusミニプレップキット(Qiage

n)またはPureYieldプラスミドミニプレップキット(Promega)を用いて精製した。これらはエンドトキシン除去ステップを包含する。生きた動物を用いる全ての実験はBroad Institute動物実験委員会によって認可された。野生型C57BL/6マウスはCharles Riverから得た(#027)。

【1149】

in vitroの生化学アッセイ

【1150】

PEgRNAおよびsgRNAは、HiScribe T7in vitro転写キット(New England Biolabs)を用いて、T7プロモーター配列を含有するPCR増幅された鋳型からin vitro転写した。RNAを変性尿素PAGEによって精製し、使用に先行して分析ゲルによって品質確認した。5'-Cy5標識DNA二重鎖基質は、ニッキングされていない基質には2つのオリゴヌクレオチド(Cy5-AVA024およびAVA025;1:1.1比)または予めニックが入った基質には3つのオリゴヌクレオチド(Cy5-AVA023、AVA025、およびAVA026;1:1.1:1.1)を用いて、95℃への3分に渡る加熱、次に室温への低速の冷却によってアニーリングした(表2A～2C)。Cas9切断および逆転写反応はdNTPを足された1×切断緩衝液中で実行した[205](20mM HEPES-K、pH7.5;100mM KCl;5%グリセロール;0.2mM EDTA、pH8.0;3mM MgCl2;0.5mM dNTPミックス;5mM DTT)。dCas9またはCas9 H840A(最終5μM)およびsgRNAまたはPEgRNA(最終5μM)を、二重鎖DNA基質(最終400nM)の追加、適用可能なときには次に開示されていないM-MLV RTバリアントSuperscript III逆転写酵素(ThermoFisher Scientific)の追加に先立って、10分に渡って5μL反応混合物中で室温においてプレインキュベーションした。反応を37℃で1時間に渡って実行し、次いで水によって10μLの体積まで希釈し、0.2μLのプロテイナーゼK溶液(20mg/mL、ThermoFisher Scientific)によって処置し、室温で30分に渡ってインキュベーションした。10分の95℃における熱不活性化後に、反応産物を2×ホルムアミドゲルローディング緩衝液(90%ホルムアミド;10%グリセロール;0.01%ブロモフェノールブルー)と組み合わせ、95℃で5分に渡って変性し、変性尿素-PAGEゲル(15%TBE-尿素、55℃、200V)によって分離した。DNA産物はTyphoon FLA 7000バイオ分子イメージャーを用いてCy5蛍光シグナルによって視覚化した。

【1151】

電気泳動移動度シフトアッセイを、プレインキュベーションされたdCas9:sgRNAまたはdCas9:PEgRNA複合体(最終5nMおよび1μMの間の濃度範囲)およびCy5標識された二重鎖DNA(Cy5-AVA024およびAVA025;最終20nM)を用いて、1×結合緩衝液(1×切断緩衝液+10μg/mLヘパリン)中で実行した。37℃における15分のインキュベーション後に、サンプルをネイティブPAGEゲル(10%TBE)によって分析し、Cy5蛍光についてイメージングした。

【1152】

逆転写産物のDNA配列決定のために、蛍光バンドを尿素-PAGEゲルから切除、精製し、次いで、ターミナルトランスフェラーゼ(TdT;New England Biolabs)によってdGTPまたはdATPの存在下において製造者のプロトコールに従って3'テーリングした。テーリングされたDNA産物を結合緩衝液(40%塩化グアニジニウム飽和水溶液+60%イソプロパノール)によって10倍希釈し、QIAquickスピンカラム(Qiagen)によって精製し、次いで、プライマーAVA134(Aテーリングされた産物)またはAVA135(Gテーリングされた産物)を用いるKlenowフラグメント(New England Biolabs)によるプライマー伸長のための鋳型として用いた(表2A-2C)。伸長を10サイクルのPCRによってプライマーAVA110およびAVA122を用いて増幅し、次いでAVA037によってSanger法を用いて配列決定した(表2A-2C)。

【1153】

酵母蛍光レポーターアッセイ

【1154】

インフレーム停止コドン、+1フレームシフト、または-1フレームシフトを含有する二

元的な蛍光レポータープラスミドを、上に記載されているとおりin vitroの5'伸長されたPEgRNAまたは3'伸長されたPEgRNAのプライム編集反応に付した。37℃での1時間のインキュベーション後に、反応を水によって希釈し、プラスミドDNAを0.3M酢酸ナトリウムおよび70%エタノールによって沈殿した。再懸濁されたDNAを先に記載されているとおりエレクトロポレーションによってS.cerevisiaeに形質転換し[67]、ロイシンなしの合成完全培地(SC(グルコース)、L-)にプレーティングした。GFPおよびmCherry蛍光シグナルをTyphoon FLA 7000バイオ分子イメージャーによってコロニーから視覚化した。

【1155】

一般的な哺乳類細胞培養条件

【1156】

HEK293T(ATCC CRL-3216)、U2OS(ATTC HTB-96)、K562(CCL-243)、およびHeLa(CCL-2)細胞はATCCから購入し、夫々が10%(v/v)ウシ胎児血清(Gibco、品質保証)および1×ペニシリンストレプトマイシン(Corning)を足された夫々ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)プラスGlutaMAX(ThermoFisher Scientific)、マッコイ5A培地(Gibco)、RPMI培地1640プラスGlutaMAX(Gibco)、またはイーグル最小必須培地(EMEM、ATCC)によって培養および継代した。全ての細胞型は37℃において5% CO_2でインキュベーション、維持、および培養した。細胞株はそれらの夫々のサプライヤーによって認証され、マイコプラズマ検査陰性であった。

【1157】

HEK293T組織培養トランスフェクションプロトコールおよびゲノムDNA調製

【1158】

成長したHEK293T細胞を48ウェルポリD-リジンコーティングプレート(Corning)上に播種した。播種の16～24時間後に、細胞を、およそ60%コンフルエンシーで、製造者のプロトコールに従う1μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)、ならびに750ngのPEプラスミド、250ngのPEgRNAプラスミド、および83ngのsgRNAプラスミド(PE3およびPE3bについて)によってトランスフェクションした。別様に申し立てられない限り、細胞はトランスフェクション後に3日培養し、これの後に培地を除去し、細胞を1×PBS溶液(Thermo Fisher Scientific)によって洗浄し、ゲノムDNAを、直接的に組織培養プレートの各ウェルへの150μLの新しく調製されたリシス緩衝液(10mM Tris-HCl、pH7.5;0.05%SDS;25μg/mLプロテイナーゼK(ThermoFisher Scientific))の追加によって抽出した。ゲノムDNA混合物を37℃で1～2時間に渡ってインキュベーションし、次に30分の80℃の酵素不活性化ステップをした。哺乳類細胞ゲノムDNA増幅に用いられたプライマーは表4に列記されている。HEK293T細胞におけるHDR実験では、231 ngのヌクレアーゼ発現プラスミド、69 ngのsgRNA発現プラスミド、50 ng(1.51 pmol)の100nt ssDNAドナー鋳型(PAGE精製済み;Integrated DNA Technologies)を、1.4 μLのLipofectamine 2000(ThermoFisher)を用いてウェル当たりリポフェクションした。全てのHDR実験からのゲノムDNAはAgencourt DNAdvanceキット(Beckman Coulter)を用いて製造者のプロトコールに従って精製した。

【1159】

ゲノムDNAサンプルのハイスループットDNA配列決定

【1160】

目当てのゲノム部位をゲノムDNAサンプルから増幅し、次の改変によって先に記載されているとおりIllumina MiSeqによって配列決定した[129,130]。手短かには、Illuminaフォワードおよびリバースアダプターを含有する増幅プライマー(表4)を第1ラウンドのPCR(PCR1)に用い、目当てのゲノム領域を増幅した。25μLのPCR1反応を、0.5μMの各フォワードおよびリバースプライマー、1μLのゲノムDNA抽出物、および12.5μLのPhusion U Green Multiplex PCRマスターミックスによって行った。PCR反応は次のとおり実行した:2分の98℃、次いで30サイクルの[10秒の98℃、20秒の61℃、お

よび30秒の72℃]、次に2分の最終の72℃伸長。固有のIlluminaバーコード化プライマーペアを二次PCR反応(PCR2)の各サンプルに追加した。具体的には、25μLの所与のPCR2反応は、0.5μMの各固有のフォワードおよびリバースilluminaバーコード化プライマーペア、1μLの未精製のPCR1反応混合物、および12.5μLのPhusion U Green Multiplex PCR 2×マスターミックスを含有した。バーコード化PCR2反応は次のとおり実行した:2分の98℃、次いで12サイクルの[10秒の98℃、20秒の61℃、および30秒の72℃]、次に2分の最終の72℃伸長。PCR産物は1.5%アガロースゲルによる電気泳動によって分析的に評価した。PCR2産物(共通アンプリコンによってプールされた)を1.5%アガロースゲルによる電気泳動によって精製した。QIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用い、40μLの水によって溶出した。DNA濃度をフルオロメトリー定量(Qubit、ThermoFisher Scientific)またはqPCR(KAPAライブラリ定量キット-Illumina、KAPA Biosystems)によって測定し、製造者のプロトコールに従ってIllumina MiSeq装置によって配列決定した。

【1161】

配列決定読取をMiSeqレポーター(Illumina)を用いてデマルチプレックスした。参照配列に対するアンプリコン配列のアラインメントをCRISPResso2を用いて行った[178]。点変異編集の定量のためには、CRISPResso2を「discard_indel_reads」オンによる標準モードで走らせた。編集効率は:(捨てられなかった読取における規定された点変異の度数)×(捨てられなかった読取の#)÷総読取として計算した。挿入または欠失編集では、CRISPResso2を「discard_indel_reads」オンで予想されるアレルとして所望のアレルを用いてHDRモードで走らせた。編集収量は総読取によって割られたHDRアラインメント読取の数として計算した。全ての編集について、インデル収量は総読取によって割られた捨てられた読取の数として計算した。

【1162】

U2OS、K562、およびHeLa細胞のヌクレオフェクション

【1163】

ヌクレオフェクションは全ての実験においてK562、HeLa、およびU2OS細胞を用いて行った。これらの細胞型のPE条件では、800ngプライム編集因子発現プラスミド、200ngのPEgRNA発現プラスミド、および83ngのニッキングプラスミドを20μLの最終体積で16ウェルnucleocuvetteストリップ(Lonza)上でヌクレオフェクションした。これらの3つの細胞型のHDR条件では、350ngヌクレアーゼ発現プラスミド、150ngのsgRNA発現プラスミド、および200pmol(6.6μg)の100nt ssDNAドナー鋳型(PAGE精製済み;Integrated DNA Technologies)をサンプル当たり20 μLの最終体積で16ウェルNucleocuvetteストリップ(Lonza)上でヌクレオフェクションした。K562細胞は、SF Cell Line 4D-Nucleofector Xキット(Lonza)を用いて、サンプル当たり5×10^5細胞で(プログラムFF-120)、製造者のプロトコールに従ってヌクレオフェクションした。U2OS細胞は、SE Cell Line 4D-Nucleofector Xキット(Lonza)を用いて、サンプル当たり3-4×10^5細胞で(プログラムDN-100)、製造者のプロトコールに従ってヌクレオフェクションした。HeLa細胞は、SE Cell Line 4D-Nucleofector Xキット(Lonza)を用いて、サンプル当たり2×10^5細胞で(プログラムCN-114)、製造者のプロトコールに従ってヌクレオフェクションした。細胞はヌクレオフェクションの72時間後にゲノムDNA抽出のために収穫した。

【1164】

HDR実験のためのゲノムDNA抽出

【1165】

HEK293T、HEK293T HBB E6V、K562、U2OS、およびHeLa細胞における全てのHDR比較実験からのゲノムDNAは、製造者のプロトコールに従ってAgencourt DNAdvanceキット(Beckman Coulter)を用いて精製した。

【1166】

PE2、PE3、BE2、BE4max、ABEdmax、およびABEmaxの間の比較

【１１６７】
HEK293T細胞を48ウェルポリD-リジンコーティングプレート(Corning)に播種した。16～24時間後に、細胞をおよそ60％コンフルエンシーでトランスフェクションした。CBEまたはABE構築物による塩基編集では、細胞を750ngの塩基編集因子プラスミド、250ngのsgRNA発現プラスミド、および1μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)によってトランスフェクションした。PEトランスフェクションは上に記載されているとおり行った。PEおよびBEのゲノムDNA抽出は上に記載されているとおり行った。
【１１６８】
公知のCas9オフターゲット部位におけるPE3活性の決定
【１１６９】
公知のCas9オフターゲット部位におけるPE3オフターゲット編集活性を評価するために、PE3によるトランスフェクションの3日後にHEK293T細胞から抽出されたゲノムDNAを、16の先に報告されたCas9オフターゲットゲノム部位のPCR増幅のための鋳型として用いた[118,159](夫々HEK3、EMX1、FANCF、およびHEK4スペーサーの上位4つのオフターゲット部位;プライマー配列は表4に列記されている)。これらのゲノムDNAサンプルは、図41A-41Kに示されているオンターゲットPE3編集活性を定量するために用いられたものと同一であった;PEgRNAおよびニッキングsgRNA配列は表3A-3Rに列記されている。オフターゲット部位のPCR増幅後に、アンプリコンを上に記載されているとおりIllumina MiSeqプラットホームによって配列決定した(HTS分析)。Cas9ヌクレアーゼ、Cas9 H840Aニッカーゼ、dCas9、ならびにPE2-dRTオンターゲットおよびオフターゲット編集活性を決定するために、HEK293T細胞を750ngの編集因子プラスミド(Cas9ヌクレアーゼ、Cas9 H840Aニッカーゼ、dCas9、またはPE2-dRT)、250ngのPEgRNAまたはsgRNAプラスミド、および1μLのLipofectamine 2000によってトランスフェクションした。ゲノムDNAを上に記載されているとおりトランスフェクションの3日後に細胞から単離した。オンターゲットおよびオフターゲットゲノム遺伝子座を表4のプライマー配列を用いてPCRによって増幅し、Illumina MiSeqによって配列決定した。
【１１７０】
HTSデータ分析をCRISPResso2を用いて行った[178]。Cas9ヌクレアーゼ、Cas9 H840Aニッカーゼ、およびdCas9の編集効率を、インデルを含有する配列決定総読取のパーセントとして定量した。PE3およびPE3-dRTオフターゲットの定量のために、アラインメントされた配列決定読取を、Cas9ニック部位において開始されるPEgRNA逆転写の予期される産物と整合する点変異、挿入、または欠失について検分した。サンプル中の総読取のうち＜0.1％の総体的な度数で生起する1ヌクレオチドバリエーションは、分析から排除した。度数≧0.1％で生起するかつPEgRNAによってコードされる編集と部分的に整合する両方である1ヌクレオチドバリエーションを含有する読取については、t検定(対応なし、片側、α=0.5)を用いて、同じスペーサーを含有するが異なる編集をコードするPEgRNAによって処置されたサンプルと比較して、バリアントが有意に高いレベルで生起するかどうかを決定した。配列決定エラーの違いを回避するために、同じMiSeqランによって同時に配列決定されたサンプル間の比較をなした。p値＞0.05の基準を満たさなかったバリアントは排除した。次いで、オフターゲットPE3編集活性を上の基準を満たす配列決定総読取のパーセンテージとして計算した。
【１１７１】
Cas9によって開始されるHDRを用いるHBB E6V変異を含有するHEK293T細胞株の生成
【１１７２】
HEK293T細胞を48ウェルプレートに播種し、およそ60％コンフルエンシーで、1.5μLのLipofectamine 2000、300ngのCas9 D10Aニッカーゼプラスミド、100ngのsgRNAプラスミド、および200ngの100mer ssDNAドナー鋳型(表5)によってトランスフェクションした。トランスフェクションの3日後に、培地を新しい培地に交換した

。トランスフェクションの4日後に、細胞を30μLのTrypLE溶液を用いて解離させ、1.5mLの培地に懸濁した。単細胞を蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)(Beckman-Coulter Astrios)によって2つの96ウェルプレートの個々のウェルに単離した。代表的なFACSソーティング例は図53A-53Bを見よ。細胞を、上に記載されているとおりゲノムDNA配列決定に先行して14日に渡って拡大培養した。単離されたクローン集団からは、いずれもHBB E6V変異についてホモ接合であることは見出されなかった。そのため、リポフェクションによる編集、ソーティング、およびアウトグロースの第2ラウンドを部分的に編集された細胞株において繰り返して、E6Vアレルについてホモ接合の細胞株を生んだ。

【１１７３】

PE3を用いるHBB E6V変異を含有するHEK293T細胞株の生成

【１１７４】

抗生物質の不在下で成長させた2.5×10^4のHEK293T細胞を48ウェルポリD-リジンコーティングプレート(Corning)に播種した。播種の16～24時間後に、細胞を、およそ70%コンフルエンシーで、製造者のプロトコールに従って1μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)、ならびに750ngのPE2-P2A-GFPプラスミド、250ngのPEgRNAプラスミド、および83ngのsgRNAプラスミドによってトランスフェクションした。トランスフェクション後の3日後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(Gibco)によって洗浄し、TrypLE Express(Gibco)を用いて解離させた。次いで、細胞を10%(v/v)FBS(Gibco)を足されたDMEMプラスGlutaMax(Thermo Fisher Scientific)によって希釈し、ソーティングに先行して35μmセルストレーナー(Corning)を通過させた。フローサイトメトリーをLE-MA900セルソーター(Sony)によって実行した。細胞は3nM DAPI(BioLegend)によってソーティングに15分先行して処置した。ダブレット除去のためのゲーティング後に、GFP陰性対照細胞集団のものよりも上のGFP蛍光を有するDAPI陰性単細胞を、10%FBSを足されたGlutaMaxありの予冷されたDMEMを充填した96ウェル平底細胞培養プレート(Corning)にソーティングした。代表的なFACSソーティング例は図53A-53Bを見よ。細胞は、上に記載されているとおり、ゲノムDNA抽出およびHTSによる特徴付けに先行して10日に渡って培養した。HBBのE6V変異についてホモ接合である合計6つのクローン細胞株を同定した。

【１１７５】

PE3を用いるHEXA 1278+TATC挿入を含有するHEK293T細胞株の生成

【１１７６】

HEXA 1278+TATCアレルを含有するHEK293T細胞を、HBB E6V細胞株の生出について上に記載されているプロトコールを踏襲して生成した;PEgRNAおよびsgRNA配列は表2A-2Cにおいて図43A-43H小見出し下に列記されている。トランスフェクションおよびソーティング後に、細胞を、上に記載されているとおりゲノムDNA抽出およびHTSによる特徴付けに先行して10日に渡って培養した。50%のHEXA 1278+TATCアレルを含有する2つのヘテロ接合体細胞株を単離し、100%のHEXA 1278+TATCアレルを含有する2つのホモ接合細胞株を回復した。

【１１７７】

細胞生存性アッセイ

【１１７８】

HEK293T細胞を48ウェルプレートに播種し、およそ70%コンフルエンシーにおいて、750ngの編集因子プラスミド(PE3、PE3 R110S K103L、Cas9 H840Aニッカーゼ、またはdCas9)、250ngのHEK3標的化PEgRNAプラスミド、および1μLのLipofectamine 2000によって、上に記載されているとおりトランスフェクションした。細胞生存性を、トランスフェクション後に3日に渡って24時間毎に測定した。製造者のプロトコールに従ってCellTiter-Glo 2.0アッセイ(Promega)を用いた。ルミネセンスを96ウェル平底ポリスチレンマイクロプレート(Corning)上でM1000 Proマイクロプレートリーダー(Tecan)を用いて1秒の積算時間で測定した。

【１１７９】
レンチウイルス生産
【１１８０】
レンチウイルスは先に記載されているとおり生じた[206]。T-75フラスコの急速に分裂するHEK293T細胞(ATCC;マナサス、VA、USA)を、インテイン分裂PE2編集因子を持つ改変されたlentiCRISPR_v2ゲノムとの組み合わせで、レンチウイルス生産ヘルパープラスミドpVSV-GおよびpsPAX2によってトランスフェクションした。製造者の説明に従ってFuGENE HD(Promega、マディソン、WI、USA)を用いた。4つの分裂インテイン編集因子構築物をデザインした:1)U6-PEgRNA発現カセットとNpu Nインテイン、自己切断P2Aペプチド、およびGFP-KASHに融合されたCas9 H840Aニッカーゼの N末端部分(1-573)とをコードするウイルスゲノム;2)PE2のC末端残りに融合されたNpu Cインテインをコードするウイルスゲノム;3)Cas9対照のためのCas9のC末端残りに融合されたNpu Cインテインをコードするウイルスゲノム;および4)DNMT1のニッキングsgRNAである。分裂インテインはPE2またはCas9の2つの半分同士を連結するためのトランススプライシングを媒介し、P2A GFP-KASHは核膜局在したGFPの共翻訳的生産を可能化する。48時間後に、上清を収集し、500gで5分に渡って遠心して細胞破片を除去し、0.45μmフィルターを用いて濾過した。濾過された上清を製造者の説明に従ってPEG-itウイルス沈殿溶液(System Biosciences、パロアルト、CA、USA)を用いて濃縮した。もたらされたペレットを元の培地体積の1%を用いてOpti-MEM(Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、MA、USA)に再懸濁した。再懸濁されたペレットを瞬間凍結し、使用まで-80℃で貯蔵した。
【１１８１】
マウス初代皮質ニューロン解剖および培養
【１１８２】
E18.5解離皮質培養物を計画妊娠C57BL/6マウス(Charles River)から収穫した。CO2による安楽死後に、胎児を妊娠マウスから収穫し、次に断頭をした。皮質キャップをペニシリン/ストレプトマイシン(Life Technologies)を足された氷冷Hibernate-E中で解剖した。氷冷Hibernate-Eによるリンス後に、組織を37℃で8分に渡ってパパイン/DNase(Worthington/Sigma)によって消化した。組織をDNaseを足されたNBActiv4(BrainBits)中でトリチュレーションした。細胞をカウントし、ウェル当たり100,000細胞で24ウェルプレートに置いた。培地の半分を週当たり2回換えた。
【１１８３】
初代ニューロンのプライム編集および核単離
【１１８４】
DIV1において、15μLのレンチウイルスを10:10:1比のN末端:C末端:ニッキングsgRNAで追加した。DIV14において、ニューロン核を製造者のプロトコールを踏襲してEZ-PREP緩衝液(Sigma D8938)を用いて単離した。全てのステップは氷上でまたは4℃で行った。培地を解離した培養物から除去し、培養物を氷冷PBSによって洗浄した。PBSをアスピレーションし、200μLのEZ-PREP溶液によって置き換えた。氷上での5分のインキュベーション後に、EZ-PREPをウェルの表面上にピペッティングし、残りの細胞を取り去った。サンプルを500gで5分に渡って遠心し、上清を除去した。サンプルを200μLのEZ-PREPによって洗浄し、500gで5分に渡って遠心した。サンプルは、穏やかなピペッティングによって、1×PBS中の100μg/mL BSAおよび3.33μM Vybrant Dye Cycle Ruby(Thermo Fisher)からなる200μL氷冷核懸濁緩衝液(NSB)に再懸濁し、次いで500gで5分に渡って遠心した。上清を除去し、核を100μLのNSBに再懸濁し、Broad Instituteフローサイトメトリー施設においてMoFlo Astrios(Beckman Coulter)を用いて100μLのAgencourt DNAdvanceリシス緩衝液中にソーティングした。ゲノムDNAは製造者のAgencourt DNAdvanceの説明書に従って精製した。
【１１８５】
RNA配列決定およびデータ分析

【１１８６】
HEK293T細胞を、PRNP標的化またはHEXA標的化PEgRNAおよびPE2、PE2-dRT、またはCas9 H840Aニッカーゼによってコトランスフェクションした。トランスフェクションの72時間後に、全RNAをTRIzol試薬(Thermo Fisher)を用いて細胞から収穫し、オンカラムのDNaseI処置を包含するRNeasyミニキット(Qiagen)によって精製した。TruSeq Stranded全RNAライブラリプレップキット(Illumina)のrRNA除去プロトコールを用いて、リボソームを全RNAから枯渇させ、続いてRNAClean XPビーズ(Beckman Coulter)によって洗浄した。製造者のプロトコールを踏襲して、SMARTer PrepX Apollo NGSライブラリプレップシステム(Takara)によって、配列決定ライブラリをリボ枯渇したRNAを用いて調製した。もたらされたライブラリを2200 TapeStation(Agilent Technologies)によって視覚化し、Qubit dsDNA HSアッセイ(Thermo Fisher)を用いて正規化し、75bpペアエンド読取として高アウトプットv2フローセル(Illumina)を用いてNextSeq 550によって配列決定した。Fastqファイルをbcl2fastq2バージョン2.20によって生成し、TrimGaloreバージョン0.6.2を用いてトリミングして(github.com/FelixKrueger/TrimGalore)、低品質塩基、非ペア配列、およびアダプター配列を除去した。トリミングされた読取を、RSEMバージョン1.3.1[207]を用いて、カスタムのCas9 H840A遺伝子エントリーによって、Homo sapiensゲノムアセンブリGRCh[148]とアラインメントした。limma-voom[208]パッケージを用いて遺伝子発現レベルを正規化し、バッチ効果補正によって差次的発現分析を行った。差次的に発現される遺伝子をFDR補正されたp値＜0.05および～倍の変化＞2のカットオフでコールし、結果をRによって視覚化した。

【１１８７】
ClinVar分析

【１１８８】
ClinVarバリアントサマリーをNCBIからダウンロードし(2019年7月15日にアクセス)、それに含有される情報を全ての下流分析に用いた。全ての報告されたバリアントのリストを、重複物を除去するためのアレルIDによって、および分析を病原性のバリアントに制限するための臨床的有意性によってフィルタリングした。挿入、欠失などである病原性のバリアントの画分を計算するためには、病原性のバリアントのリストをバリアント型によって逐次的にフィルタリングした。1ヌクレオチドバリアント(SNV)を、報告された参照および代替対立遺伝子に基づいて2つのカテゴリー(トランジションおよびトランスバージョン)に分離した。参照または代替対立遺伝子を報告しなかったSNVは分析から排除した。

【１１８９】
報告された挿入、欠失、および重複の長さを、参照/代替対立遺伝子、バリアントスタート/ストップ位置、またはバリアント名称の適当な識別情報を用いて計算した。上の情報のいずれかを報告しないバリアントは分析から排除した。報告されたインデル(参照ゲノムに対して相対的に挿入および欠失両方を包含する単一のバリアント)の長さは、参照および代替対立遺伝子間の最も良好なペアワイズアラインメントにおけるミスマッチまたはギャップの数を決定することによって計算された。バリアント長さの度数分布はGraphPad Prism 8を用いて計算された。

【１１９０】
データ利用性

【１１９１】
ハイスループット配列決定データはNCBI配列読取アーカイブデータベースに寄託されている。PE1、PE2/PE3、およびPEgRNA発現ベクターをコードするプラスミドはAddgeneから利用可能であろう。

【１１９２】
コード利用性

【１１９３】

PEgRNA骨格挿入を定量するために用いられるスクリプトは図60A-60Bに提供される。

【１１９４】

補足情報:表および配列

【１１９５】

表1:HEK3、HEK4、EMX1、およびFANCFオンターゲットおよびオフターゲット部位におけるプライム編集因子、Cas9ヌクレアーゼ、Cas9 H840Aニッカーゼ、およびPE2-dRTの活性。PE2/PE3編集が%インデル(括弧内)と並べて%プライム編集として示されている。%インデルは、Cas9、Cas9 H840Aニッカーゼ(nCas9)、およびPE2-dRTについて、上位4つの先に特徴付けられたオフターゲット部位において示されている[179,180]。sgRNAおよびPEgRNA配列は表3A～3Rにおいて図42A-42Hの見出しの下に見出され得る。全ての値は3つの独立した生物学的レプリケートの平均である。

【表６７】

PE: pegRNA / 部位	HEK3 (PE3) ---	1	2	3	4	HEK4 (PE2) ---	1	2	3	4	EMX1 (PE3) ---	1	2	3	4	FANCF (PE3) ---	1	2	3	4
オンターゲット		44.2 (11.9)	51.2 (8.8)	40.4 (16.5)	48.4 (3.3)		18.2 (0.9)	14.4 (1.5)	9.8 (2.0)	7.9 (2.2)		28.6 (3.5)	14.1 (2.4)	35.7 (3.3)	15.4 (2.9)		56.8 (9.3)	32.4 (16.7)	42.8 (13.6)	47.6 (12.0)
オフターゲット1		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)		<0.1 (<0.1)	0.4 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	0.4 (<0.1)		<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)		<0.1 (0.1)	0.6 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)
オフターゲット2		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)		<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)		<0.1 (<0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (<0.1)
オフターゲット3		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)		0.2 (0.5)	6.5 (1.9)	19.2 (0.5)	7.9 (3.5)		<0.1 (0.3)	<0.1 (0.3)	<0.1 (0.3)	<0.1 (0.3)		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)
オフターゲット4		<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (<0.1)		<0.1 (<0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.2)	<0.1 (<0.1)		<0.1 (0.1)	<0.1 (0.1)	<0.1 (0.2)	<0.1 (0.1)		<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)

Cas9: pegRNA / 部位	HEK3 sgRNA	1	2	3	4	HEK4 sgRNA	1	2	3	4	EMX1 sgRNA	1	2	3	4	FANCF sgRNA	1	2	3	4
オンターゲット	91.8	87.5	89.2	89.1	88.8	71.8	68.8	72.8	72.8	70.8	85.6	79.7	70.8	76.6	76.0	78.7	55.9	58.3	51.8	52.0
オフターゲット1	17.2	1.9	5.5	5.2	1.8	54.2	39.5	46.4	49.7	48.2	81.1	63.5	48.1	53.0	59.8	12.6	1.9	1.9	1.7	1.7
オフターゲット2	38.0	8.5	12.8	11.8	4.7	42.5	19.5	29.4	27.3	30.3	58.3	12.0	6.0	9.2	12.8	1.1	0.2	0.2	0.2	0.1
オフターゲット3	8.8	0.8	1.7	1.5	0.5	98.1	96.9	97.3	97.6	97.5	14.8	4.2	3.1	3.8	4.8	2.4	0.2	<0.1	0.2	0.2
オフターゲット4	0.3	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	45.3	16.9	28.0	27.5	29.7	39.5	1.3	0.9	0.6	1.3	1.0	0.2	0.2	0.2	0.2

nCas9: pegRNA / 部位	HEK3 ---	1	2	3	4	HEK4 ---	1	2	3	4	EMX1 ---	1	2	3	4	FANCF ---	1	2	3	4
オフターゲット1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		0.1	0.1	<0.1	0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット2		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	< 0.1	<0.1		0.3	0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット3		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		0.3	0.5	0.7	0.7		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット4		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	0.1	<0.1	<0.1		1.5	0.1	0.1	0.4		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

PE2-dRT: pegRNA / 部位	HEK3 ---	1	2	3	4	HEK4 ---	1	2	3	4	EMX1 ---	1	2	3	4	FANCF ---	1	2	3	4
オフターゲット1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		0.1	0.2	<0.1	<0.1		0.1	0.1	0.1	0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット2		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	0.1	<0.1	<0.1		<0.1	0.3	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット3		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	0.1	1.4	0.9		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
オフターゲット4		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		0.1	0.1	0.1	0.2		0.9	0.1	0.1	0.2		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

【１１９６】

表2A～2C:in vitroでの実験のために使用されたDNAオリゴヌクレオチド、PEgRNA

、およびsgRNAの配列。

【１１９７】

表2A:DNAオリゴヌクレオチド

【表６８】

オリゴヌクレオチド	配列
AVA023	5CY5-CCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACG(配列番号 374)
AVA024	5CY5-CCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACGTGATGGCAGAGGAAAGG(配列番号 375)
AVA025	5PHOS-CCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTGGGCCCCAAGGATTGACCCAGG(配列番号 376)
AVA026	5PHOS-TGATGGCAGAGGAAAGG(配列番号 377)
AVA037	GCAGGCTTTAAAGGAACCAATTC(配列番号 378)
AVA110	GCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCCCTGGGTCAATCCTTGGGGC(配列番号 379)
AVA122	CTCTGGAGGATCTAGCGGAG(配列番号 380)
AVA134	CTCTGGAGGATCTAGCGGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(配列番号 381)
AVA135	CTCTGGAGGATCTAGCGGAGCCCCCCCCCCCCCC(配列番号 382)

【１１９８】

表2B:5'-伸長されたPEgRNA

【表６９】

PEGRNA	スペーサー配列	5’伸長配列	リンカー長(NT)	PBS長(NT)	RT鋳型長(NT)
PEGRNA 1	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号383)	GGCTAACCGTGCCATTTGATCAGGTCA(配列番号429)	15	5	7
PEGRNA 2	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号384)	GGCTAACCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号430)	15	5	7
PEGRNA 3	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号385)	GGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号431)	15	5	8
PEGRNA 4	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号386)	GGTCCTCTGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号432)	15	5	15
PEGRNA 5	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号387)	GGCTTCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号433)	15	5	22
5′-PEGRNA_RT_7_A	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号388)	GGCTAACCGTGCCATTTGATCAGGTCA(配列番号434)	15	5	7
5′-PEGRNA_RT_7_B	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号389)	GGCTAACCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号435)	15	5	7
5′-PEGRNA_RT_8	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号390)	GGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号436)	15	5	8
5′-PEGRNA_RT_15	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号391)	GGTCCTCTGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号437)	15	5	15
5′-PEGRNA_RT_22	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号392)	GGCTTCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCAAATTAACAAACTAA(配列番号438)	15	5	22

【１１９９】

表2C:3'-伸長されたPEgRNA

【表７０】

PEGRNA	スペーサー配列	3’伸長配列	PBS長(NT)	RT鋳型長(NT)
3′-PEGRNA_10	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号506)	TCTGCCATCTCGTGCTC(配列番号439)	7	10
3′-PEGRNA_YEAST_TTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号507)	TCTGCCATCTCGTGCTC(配列番号440)	7	10
3′-PEGRNA_YEAST_+1AINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号508)	TCTGCCATCATCGTGCTC(配列番号441)	7	11
3′-PEGRNA_YEAST_+1TDEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号509)	TCTGCCATCCGTGCTC(配列番号442)	7	9

【１２００】

表3A～3R:哺乳類細胞実験に用いられたPEgRNAおよびsgRNAの配列。全ての配列は5'→3'の向きで示されている。PEgRNAを構築するためには、下に列記されるスペーサー配列をsgRNA骨格の5'端に追加し、プライマー結合部位とRT鋳型とを含有する下に列

記される3'伸長をsgRNA骨格の3'端に追加した。sgRNA骨格配列はGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC(配列番号131)である。

【１２０１】

表3A:図39A～39D PEgRNA

【表７１－１】

PEGRNA	スペーサー配列 (配列番号 2890-2996)	3'伸長 (配列番号 2997-3103)	PBS長 (NT)	RT鋳型長 (NT)
HEK3_2B-C_8	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCA	8	10
HEK3_2B-C_9	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAG	9	10

【表７１－２】

HEK3_2B-C_10	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGT	10	10
HEK3_2B-C_11	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTC	11	10
HEK3_2B-C_12	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCT	12	10
HEK3_2B-C_13	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_2B-C_14	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTGG	14	10
HEK3_2B-C_15	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTGGG	15	10
HEK3_2C_16	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTGGGC	16	10
HEK3_2C_17	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTGGGCC	17	10
EMX1_2C_9	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGC	9	13
EMX1_2C_10	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCT	10	13
EMX1_2C_11	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTC	11	13
EMX1_2C_12	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCG	12	13
EMX1_2C_13	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGG	13	13
EMX1_2C_14	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	13
EMX1_2C_15	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGAC	15	13
EMX1_2C_16	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGACT	16	13
EMX1_2C_17	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGACTC	17	13
FANCF_2C_8	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGA	8	17
FANCF_2C_9	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAA	9	17
FANCF_2C_10	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAG	10	17
FANCF_2C_11	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGG	11	17
FANCF_2C_12	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGG	12	17
FANCF_2C_13	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	17
FANCF_2C_14	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17

【表７１－３】

FANCF_2C_15	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGATT	15	17
FANCF_2C_16	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGATTC	16	17
FANCF_2C_17	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGATTCC	17	17
RNF2_2C_9	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACT	9	11
RNF2_2C_10	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTA	10	11
RNF2_2C_11	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAA	11	11
RNF2_2C_12	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAG	12	11
RNF2_2C_13	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGA	13	11
RNF2_2C_14	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGAT	14	11
RNF2_2C_15	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	11
RNF2_2C_16	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGATGA	16	11
RNF2_2C_17	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGATGAC	17	11
HEK4_2C_7	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAG	7	13
HEK4_2C_8	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGC	8	13
HEK4_2C_9	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCC	9	13
HEK4_2C_10	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCG	10	13
HEK4_2C_11	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	13
HEK4_2C_12	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGCA	12	13
HEK4_2C_13	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGCAG	13	13
HEK4_2C_14	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGCAGT	14	13
HEK4_2C_15	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGCAGTG	15	13
HEK3_2C_1TDEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_2C_1AINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCATCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_2C_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	10

【表７１－４】

HEK3_2D_10	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_2D_11	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	CTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	11
HEK3_2D_12	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	CCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	12
HEK3_2D_13	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	13
HEK3_2D_14	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	14
HEK3_2D_15	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	15
HEK3_2D_16	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	CTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	16
HEK3_2D_17	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	CCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	17
HEK3_2D_18	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	18
HEK3_2D_19	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TTCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	19
HEK3_2D_20	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	CTTCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	20
EMX1_2D_10	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	10
EMX1_2D_11	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	11
EMX1_2D_12	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	TGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	12
EMX1_2D_13	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	13
EMX1_2D_14	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	14
EMX1_2D_15	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	TGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	15
EMX1_2D_16	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	16
EMX1_2D_17	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	TGTGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	17
EMX1_2D_18	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGTGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	18
EMX1_2D_19	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GATGTGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	19
EMX1_2D_20	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	TGATGTGATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	20
FANCF_2D_10	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	CGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	10
FANCF_2D_11	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	11

【表７１－５】

FANCF_2D_12	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	AGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	12
FANCF_2D_13	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	AAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	13
FANCF_2D_14	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	AAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	14
FANCF_2D_15	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	AAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	15
FANCF_2D_16	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	16
FANCF_2D_17	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	17
FANCF_2D_18	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	CGGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	18
FANCF_2D_19	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	TCGGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	19
FANCF_2D_20	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	CTCGGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	20
RNF2_2D_10	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	10
RNF2_2D_11	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	11
RNF2_2D_12	GTCATCTTAGTCATTACCTG	CGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	12
RNF2_2D_13	GTCATCTTAGTCATTACCTG	ACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	13
RNF2_2D_14	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_2D_15	GTCATCTTAGTCATTACCTG	CAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	15
RNF2_2D_16	GTCATCTTAGTCATTACCTG	ACAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	16
RNF2_2D_17	GTCATCTTAGTCATTACCTG	TACAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	17
RNF2_2D_18	GTCATCTTAGTCATTACCTG	TTACAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	18
RNF2_2D_19	GTCATCTTAGTCATTACCTG	GTTACAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	19
RNF2_2D_20	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AGTTACAACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	20
HEK4_2D_7	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	ACCCCAACCTCCAGCCGC	11	7
HEK4_2D_8	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	AACCCCAACCTCCAGCCGC	11	8
HEK4_2D_9	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	9
HEK4_2D_10	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	10

【表７１－６】

HEK4_2D_11	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	11
HEK4_2D_12	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	12
HEK4_2D_13	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	13
HEK4_2D_14	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	14
HEK4_2D_15	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CCGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	15
HEK4_2D_16	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TCCGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	16
HEK4_2D_17	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CTCCGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	17
HEK4_2D_18	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CTCCGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	18
HEK4_2D_19	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	CTCCGCTTTAACCCCAACCTCCAGCCGC	11	19

【１２０２】

表３B:図４０A～４０C PEgRNA

【表７２】

PEGRNA	スペーサー配列（配列番号 3104-3112)	3'伸長（配列番号 3113-3121)	PBS長 (NT)	RT鋳型長 (NT)
RNF2_3B	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	14
EMX1_3B	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGAC	15	13
FANCF_3B	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGATT	15	17
HE3_3B	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATGACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK4_3B	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACCCCAACCTCCAGCC	9	10
RNF2_3C_4ATOC	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCGCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_3C_4ATOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCCCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
FANCF_3C_5GTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	17
FANCF_3C_7ATOC	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGAGCCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17

【１２０３】

表３C:図４０A～４０C ニックを入れるsgRNA配列

【表７３】

ニックを入れるSGRNA	スペーサー配列	配列番号
RNF2_2B_+41	GTCAACCATTAAGCAAAACAT	**3122**
RNF2_2B_+67	GTCTCAGGCTGTGCAGACAAA	**3123**
EMX1_2B_-116	GGGGCACAGATGAGAAACTC	**3124**
EMX1_2B_-57	GCCGTTTGTACTTTGTCCTC	**3125**
EMX1_2B_+14	GCGCCACCGGTTGATGTGAT	**3126**
EMX1_2B_+27	GCTTCGTGGCAATGCGCCAC	**3127**
EMX1_2B_+53	GACATCGATGTCCTCCCCAT	**3128**
EMX1_2B_+80	GTGGTTGCCCACCCTAGTCAT	**3129**
FANCF_2B_-78	GCGACTCTCTGCGTACTGAT	**3130**
FANCF_2B_-50	GCCCTACTTCCGCTTTCACCT	**3131**
FANCF_2B_-27	GGATTCCATGAGGTGCGCGA	**3132**
FANCF_2B_-17	GCTGCAGAAGGGATTCCATG	**3133**
FANCF_2B_+21	GCTTGAGACCGCCAGAAGCT	**3134**
FANCF_2B_+48	GGGGTCCCAGGTGCTGACGT	**3135**
HEK3_2B_-108	GCAGAAATAGACTAATTGCA	**3136**
HEK3_2B_-38	GGATTGACCCAGGCCAGGGC	**3137**
HEK3_2B_+26	GACGCCCTCTGGAGGAAGCA	**3138**
HEK3_2B_+37	GCTGTCCTGCGACGCCCTC	**3139**
HEK3_2B_+63	GCACATACTAGCCCCTGTCT	**3140**
HEK3_2B_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	**3141**
HEK4_2B_-95	TCCCTTCCTTCCACCCAGCC	**3142**
HEK4_2B_-51	CCCTGCCTGTCATCCTGCTT	**3143**
HEK4_2B_-26	GCAGTGCCACCGGGGCGCCG	**3144**
HEK4_2B_+52	GCGGGGGCTCAGAGAGGGCA	**3145**
HEK4_2B_+74	GAGACACACACACAGGCCTGG	**3146**
RNF2_2C_+41	GTCAACCATTAAGCAAAACAT	**3147**
RNF2_2C_4ATOC_+5	GTGAGTTACAACGAACACCGC	**3148**
RNF2_2C_4ATOG_+5	GTGAGTTACAACGAACACCCC	**3149**
FANCF_2C_+48	GGGGTCCCAGGTGCTGACGT	**3150**
FANCF_2C_5GTOT_+7	GAAGCTCGGAAAAGCGATCA	**3151**
FANCF_2C_7ATOC_+7	GAAGCTCGGAAAAGCGAGCC	**3152**
HEK3_2C_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	**3153**

【１２０４】

表３D:図４１A～４１K PEgRNA

【表７４－１】

PEGRNA	スペーサー配列 (配列番号 3154-3304)	3'伸長 (配列番号 3305-3455)	PBS 長 (NT)	RT 鋳型長 (NT)
HEK3_4A_1TTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_1TTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCGCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_1TTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCCGTGCTCAGTCTG	13	10

【表７４－２】

HEK3_4A_2GTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATTACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_2GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATGACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_2GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATAACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_3ATOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCAGCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_3ATOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCACCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_3ATOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCAACACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_4TTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCTTCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_4TTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCGTCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_4TTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCCTCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_5GTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCTATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_5GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCGATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_5GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCAATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_6GTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGTCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_6GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGGCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_6GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGACATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_7CTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTTCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_7CTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTCCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_7CTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTACCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_8ATOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCGGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_8ATOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCCGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4A_8ATOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCAGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_4B_1TTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_12GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTGCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34

【表７４－３】

HEK3_4B_14ATOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTATCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_17GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTGCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_20GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGGTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_23CTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCACGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_24TTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCTGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_26CTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAACCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_30CTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGACGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_4B_33CTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACGTGCTCAGTCTG	13	34
RNF2_4C_1CTOA	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_1CTOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCACGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_1CTOT	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCAAGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_2TTOA	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCTGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_2TTOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCCGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_3GTOC	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTGAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_4ATOC	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCGCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_4ATOT	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCACAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_4ATOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCCCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_5GTOT	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACATCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_6GTOA	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACATCTCAGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4C_7TTOC	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACGCCTCAGGTAATGACTAAGATG	15	14

【表７４－４】

FANCF_4D_1ATOG	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAGGCGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_1ATOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAGGAGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_2CTOA	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAGTTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_3CTOG	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCACGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_3CTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAAGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_4TTOA	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCTGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_4TTOG	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCCGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_5GTOA	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCTAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_6GTOC	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATGCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_7ATOC	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGAGCCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_8TTOC	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGGTCCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_4D_10GTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGAGATCCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
EMX1_4E_2ATOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTGCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_2ATOT	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTACTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_3ATOG	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCCTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_4GTOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCGTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_5GTOA	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCTCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_5GTOT	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_7CTOA	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGATCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_8TTOA	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGTGCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_8TTOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGGGCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_8TTOG	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGCGCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_9CTOG	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGCAGCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_4E_9CTOT	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGAAGCCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16

【表７４－５】

RUNX1_4F_1CTOA	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATCTCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_1CTOG	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATCCCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_1CTOT	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATCACTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_2GTOA	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATTGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_3ATOC	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCAGCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_3ATOG	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCACCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_3ATOT	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCAACGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_4TTOA	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCTTCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_4TTOC	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCGTCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_4TTOG	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCCTCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_5GTOT	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_4F_6GTOC	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGGCATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
VEGFA_4G_1TTOA	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCTCTTCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_1TTOC	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCTCGTCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_1TTOG	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCTCCTCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_2GTOA	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCTTATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_3ATOC	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCGCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_3ATOG	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCCCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_3ATOT	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCACATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_5GTOT	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_6GTOC	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGGCCTCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_7CTOA	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGATCCCTCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_7CTOT	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAACCCTCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_4G_9CTOG	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGCAGCCCTCATCTGGCCTGCAGA	13	22

【表７４－６】

DNMT1_4H_1ATOC	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCTGGTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_1ATOG	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCTGCTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_2CTOA	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCTTTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_2CTOG	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCTCTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_2CTOT	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCTATTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_3ATOT	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCCAGTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_4GTOA	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCCTTGTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_5GTOT	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_6GTOC	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACGCCTGTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_4H_8TTOA	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GCCCTCCCGTCTCCCCTGTTTCTGGCACCAGG	13	19
DNMT1_4H_8TTOC	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GCCCTCCCGTCGCCCCTGTTTCTGGCACCAGG	13	19
DNMT1_4H_8TTOG	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GCCCTCCCGTCCCCCCTGTTTCTGGCACCAGG	13	19
HEK3_4J_DEL1-5	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCGTGCTCAGTCTG	13	29
HEK3_4J_DEL1-10	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCCGTGCTCAGTCTG	13	24
HEK3_4J_DEL1-15	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCCGTGCTCAGTCTG	13	19
HEK3_4J_DEL1-25	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGTCCTGCGACGCCCTCTGGAGGAAGCGTGCTCAGTCTG	13	26
HEK3_4J_DEL1-30	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGTCCTGCGACGCCCTCTGGACGTGCTCAGTCTG	13	21
HEK3_4J_DEL1-80	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	AGTATCCCGGTGCAGGAGCTCGTGCTCAGTCTG	13	20
HEK3_4I_1AINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCATCGTGCTCAGTCTG	13	11
HEK3_4I_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	13
HEK3_4I_1TDEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCGTGCTCAGTCTG	13	9
HEK3_4I_1-3TGADEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCACGTGCTCAGTCTG	13	31

【表７４－７】

RNF2_4I_1TINS	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCAGAGTAATGACTAAGATG	15	15
RNF2_4I_1GTAINS	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCAGTACGTAATGACTAAGATG	15	17
RNF2_4I_4ADEL	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCCAGGTAATGACTAAGATG	15	13
RNF2_4I_3-5GAGDEL	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACAGGTAATGACTAAGATG	15	11
FANCF_4I_3CINS	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAGGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	18
FANCF_4I_4GATINS	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAATCGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	20
FANCF_4I_6GDEL	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	16
FANCF_4I_5-7GGADEL	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGAAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	14
EMX1_4I_6TINS	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCACCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	17
EMX1_4I_1TGCINS	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTTCGCATTCTTCTGCTCGGA	14	19
EMX1_4I_5GDEL	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	15
EMX1_4I_4-6GGGDEL	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	13
RUNX1_4I_1CINS	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATCGGCTTCCTCCTGAAAAT	15	16
RUNX1_4I_1ATGINS	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATCCATGCTTCCTCCTGAAAAT	15	18
RUNX1_4I_2GDEL	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCATGCTTCCTCCTGAAAAT	15	14
RUNX1_4I_2-4GATDEL	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	12
VEGFA_4I_4CINS	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCGCTCATCTGGCCTGCAGA	13	23
VEGFA_4I_2ACAINS	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCTTGTCATCTGGCCTGCAGA	13	25
VEGFA_4I_3ADEL	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCCCATCTGGCCTGCAGA	13	21
VEGFA_4I_2-4GAGDEL	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCCATCTGGCCTGCAGA	13	19
DNMT1_4I_4CINS	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCCCGTCACCCGCTGTTTCTGGCACCAGG	13	16
DNMT1_4I_1TCAINS	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCCCGTCACCCCTGTGATTTCTGGCACCAGG	13	18

【表７４－８】

DNMT1_4I_3ADEL	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCCCGTCACCCCGTTTCTGGCACCAGG	13	14
DNMT1_4I_3-5AGGDEL	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCCCGTCACCGTTTCTGGCACCAGG	13	12
HEK3_4K_1CTTINS_5GDEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	36
HEK3_4K_1CTTINS_2GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATGAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	37
HEK3_4K_3TDEL_5GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCGATCCGTGCTCAGTCTG	13	33
HEK3_4K_3GTOC_6GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGACATGACGTGCTCAGTCTG	13	34
RNF2_4K_2AAINS_3-4GADEL	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCATTGGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_4K_1AINS_5GTOC	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACGTCAGTGTAATGACTAAGATG	15	15
RNF2_4K_1-2CTDEL_6GTOT	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACAACTCGTAATGACTAAGATG	15	12
RNF2_4K_1CTOA_5GTOT	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACATCATGTAATGACTAAGATG	15	14
FANCF_4K_1TINS_3-4TGDEL	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCGGTAGCTGCAGAAGGGAT	14	16
FANCF_4K_1TINS_6GTOA	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATTCAGGTAGCTGCAGAAGGGAT	14	18
FANCF_4K_2CDEL_5GTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCAAGTGCTGCAGAAGGGAT	14	16

【１２０５】

表3E:図４１Ａ～４１Ｋニックを入れるｓｇＲＮＡ

【１２０６】

【表７５－１】

ニックを入れるSGRNA	スペーサー配列　（配列番号 3456-3463）
HEK3_4A_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC
HEK3_4B_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC
RNF2_4C_+41	GTCAACCATTAAGCAAAACAT
FANCF_4D_+48	GGGGTCCCAGGTGCTGACGT

【表７５－２】

EMX1_4E_+53	GACATCGATGTCCTCCCCAT
RUNX1_4F_+38	GATGAAGCACTGTGGGTACGA
VEGFA_4G_+57	GATGTACAGAGAGCCCAGGGC
DNMT1_4H_+49	GCCCTTCAGCTAAAATAAAGG

【１２０７】

表3F:図42A～42H PEgRNA

【１２０８】

【表７６】

PEGRNA	スペーサー配列(配列番号 3464-3478)	3'伸長 (配列番号 3479-3493)	PBS長 (NT)	RT鋳型長 (NT)
HEK3_5A_C3	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGTCATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_5A_C4	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCTATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_5A_C7	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATTACGTGCTCAGTCTG	13	10
FANCF_5A_C3	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGTGATCCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_5A_C7	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATTCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_5A_C8	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCTAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
EMX1_5A_C5	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTCCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5A_C6	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCTCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5A_C7	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCTTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5C_C5_6	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTTCTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5C_C5_7	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTCTTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5C_C6_7	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCTTTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5C_C5_6_7	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTTTTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
HEK3_5D_A5	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCGTCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_5D_A8	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCGCGTGCTCAGTCTG	13	10

【１２０９】

表3G:図42A～42Hニックを入れるsgRNA

【表７７－１】

ニックを入れるSGRNA	あり得るスペーサー配列 (配列番号 616-618)	あり得るスペーサー配列 (配列番号 619-621)

【表７７－２】

HEK3_5A-F_+90	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	GTCAACCAGTATCCCGGTGC
FANCF_5A-F_+48	GGGGTCCCAGGTGCTGACGT	GATGTACAGAGAGCCCAGGGC
EMX1_5A-F_+57	GATGTACAGAGAGCCCAGGGC	GGGGTCCCAGGTGCTGACGT

【１２１０】

表３H:図４２A～４２H塩基編集sgRNA

【表７８】

塩基編集sgRNA	スペーサー配列
HEK3_5a-f_BE	GTGCCATCACGTGCTCAGTCT(配列番号455)
FANCF_5a-f_BE	GAGCGATCCAGGTGCTGCAGA(配列番号456)
EMX1_5a-f_BE	GGAGCCCTTCTTCTTCTGCT(配列番号 457)

【１２１１】

表３I:図４２A～４２Hオンターゲットsg RNA

【表７９】

オンターゲットSGRNA	スペーサー配列
HEK3_5G	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号 510)
HEK4_5G	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG(配列番号 511)
EMX1_5G	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA(配列番号 512)
FANCF_5G	GGAATCCCTTCTGCAGCACC(配列番号 513)

【１２１２】

表３J:図４２A～４２H オンターゲットPEgRNA

【表８０－１】

オンターゲット PEGRNA	スペーサー配列 (配列番号 663-677)	3'伸長 (配列番号 678-692)	PBS 長 (NT)	RT 鋳型長 (NT)
HEK3_5G-H_PEGRNA_1	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCTCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_5G-H_PEGRNA_2	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	13
HEK3_5G-H_PEGRNA_3	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCGTGCTCAGTCTG	13	9
HEK3_5G-H_PEGRNA_4	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCGATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK4_5G-H_PEGRNA_1	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACGCCCACCTCCAGCC	9	10
HEK4_5G-H_PEGRNA_2	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACCCCCCCCTCCAGCC	9	10

【表８０－２】

HEK4_5G-H_PEGRNA_3	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACCCCTTACACCTCCAGCC	9	13
HEK4_5G-H_PEGRNA_4	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	TTAACCCCCCCTCCAGCC	9	9
EMX1_5G-H_PEGRNA_1	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCACTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5G-H_PEGRNA_2	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTGCTTCTTCTGCTCGGA	14	16
EMX1_5G-H_PEGRNA_3	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGCCCTTCGCATTCTTCTGCTCGGA	14	19
EMX1_5G-H_PEGRNA_4	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	GTGATGGGAGTTCTTCTTCTGCTCGGA	14	13
FANCF_5G-H_PEGRNA_1	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATGCAGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_5G-H_PEGRNA_2	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAGGCGCTGCAGAAGGGAT	14	17
FANCF_5G-H_PEGRNA_3	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	GGAAAAGCGATCCAATCGGTGCTGCAGAAGGGAT	14	20

【１２１３】

表３K:図４９Ａ～４９Ｂ ＰＥｇＲＮＡ

【表８１－１】

PEGRNA	スペーサー配列(配列番号3494-3521)	3'伸長(配列番号3522-3540)	PBS長(NT)	RT鋳型長(NT)
HEK3_6A_2GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATGACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_6A_2GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA			
EMX1_6A_3GTOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	13
EMX1_6A_3GTOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA			
FANCF_6A_5GTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC	AAAAGCGATCAAGGTGCTGCAGAAGGGA	13	15
FANCF_6A_5GTOT	GGAATCCCTTCTGCAGCACC			
HEK3_6A_1HIS6INS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCAATGATGGTGATGATGGTGCGTGCTCAGTCTG	13	52
HEK3_6A_1HIS6INS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA			
HEK3_6A_5GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCAATCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_6A_5GTOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA			

【表８１－２】

HEK3_6A_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_6A_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA			
*HBB*_6B_INSALL	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	AGACTTCTCCACAGGAGTCAGGTGCAC	13	14
*HBB*_6B_INSALL	GCATGGTGCACCTGACTCCTG			
*HBB*_6B_CORRECT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	AGACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTGCAC	13	14
*HBB*_6B_CORRECT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG			
*HBB*_6B_CORRECT_W_SILENT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	AGACTTCTCTTCAGGAGTCAGGTGCAC	13	14
*HBB*_6B_CORRECT_W_SILENT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG			
*HEXA*_6B_INSTALL	GTACCTGAACCGTATATCCTA	AGTCAGGGCCATAGGATAGATATACGGTTC	12	14
*HEXA*_6B_CORRECT	GATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	21
*HEXA*_6B_CORRECT_W_SILENT	GATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	GTACCTGAACCGTATATCTTATGGCCCTGACT	9	27
*PRNP*_6C	GCAGTGGTGGGGGGCCTTGG	ATGTAGACGCCAAGGCCCCCCACC	12	12
HEK3_6E-G_1TTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_6E-G_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	10
RNF2_6E-G_1CTOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCACGTAATGACTAAGATG	15	14
*HBB*_6E-G_4ATOT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	AGACTTCTCCACAGGAGTCAGGTGCAC	13	14
HEK3_6H_1HIS6INS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCAATGATGGTGATGATGGTGCGTGCTCAGTCTG	13	52
HEK3_6H_1FLAGINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCGTGCTCAGTCTG	13	58

【１２１４】

表３Ｌ:図４７Ａ～７４Ｄ ＰＥｇＲＮＡ

【表８２】

PEGRNA	スペーサー配列 (配列番号 3541-3547)	3'伸長配列 (配列番号 3549-3556)	PBS長 (NT)	RT鋳型長 (NT)
HEK3_ED4B_1TDEL	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCGTGCTCAGTCTG	13	9
HEK3_ED4B_1AINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCATCGTGCTCAGTCTG	13	11
HEK3_ED4B_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	13
HEK3_ED4C_2GTOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATGACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_ED4D_1FLAGINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCGTGCTCAGTCTG	13	58
RNF2_ED4E_1CTOA	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	14
EMX1_ED4F_1GTOC	GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA	ATGGGAGCCCTTGTTCTTCTGCTCGG	13	13
*HBB*_ED4G_2TTOA	GTAACGGCAGACTTCTCCTC	ATCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCC	12	14

【１２１５】

表３Ｍ:図４８Ａ～４８Ｃ ＰＥｇＲＮＡ

【表８３－１】

PEGRNA	スペーサー配列(配列番号 3557-3627)	3'伸長配列 (配列番号 3628-3698)	PBS長 (NT)	RT鋳型長 (NT)
VEGFA_ED5A_31	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CCCTCTGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	31
VEGFA_ED5A_30	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CCTCTGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	30
VEGFA_ED5A_29	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CTCTGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	29
VEGFA_ED5A_28	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TCTGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	28
VEGFA_ED5A_27	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CTGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	27

【表８３－２】

VEGFA_ED5A_26	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TGACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	26
VEGFA_ED5A_25	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	GACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	25
VEGFA_ED5A_24	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	ACAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	24
VEGFA_ED5A_23	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CAATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	23
VEGFA_ED5A_22	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	22
VEGFA_ED5A_21	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	ATGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	21
VEGFA_ED5A_20	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TGTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	20
VEGFA_ED5A_19	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	GTGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	19
VEGFA_ED5A_18	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TGCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	18
VEGFA_ED5A_17	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	GCCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	17
VEGFA_ED5A_16	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CCATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	16
VEGFA_ED5A_15	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	15
VEGFA_ED5A_14	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	ATCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	14
VEGFA_ED5A_13	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TCTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	13
VEGFA_ED5A_12	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	CTGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	12
VEGFA_ED5A_11	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	TGGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	11
VEGFA_ED5A_10	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	GGAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	10
VEGFA_ED5A_9	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	GAGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	9
VEGFA_ED5A_8	GATGTCTGCAGGCCAGATGA	AGCACTCATCTGGCCTGCAGA	13	8

【表８３－３】

DNMT1_ED5B_31	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	AGGACTAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	31
DNMT1_ED5B_30	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GGACTAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	30
DNMT1_ED5B_29	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GACTAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	29
DNMT1_ED5B_28	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	ACTAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	28
DNMT1_ED5B_27	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CTAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	27
DNMT1_ED5B_26	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TAGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	26
DNMT1_ED5B_25	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	AGTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	25
DNMT1_ED5B_24	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	24
DNMT1_ED5B_23	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TTCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	23
DNMT1_ED5B_22	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	22
DNMT1_ED5B_21	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CTGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	21
DNMT1_ED5B_20	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TGCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	20
DNMT1_ED5B_19	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GCCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	19
DNMT1_ED5B_18	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CCCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	18
DNMT1_ED5B_17	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CCTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	17
DNMT1_ED5B_16	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CTCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	16
DNMT1_ED5B_15	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	15

【表８３－４】

DNMT1_ED5B_14	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CCCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	14
DNMT1_ED5B_13	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CCGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	13
DNMT1_ED5B_12	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CGTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	12
DNMT1_ED5B_11	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	GTCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	11
DNMT1_ED5B_10	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	TCACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	10
DNMT1_ED5B_9	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	CACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	9
DNMT1_ED5B_8	GATTCCTGGTGCCAGAAACA	ACCACTGTTTCTGGCACCAGG	13	8
RUNX1_ED5C_31	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	AATGACTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	31
RUNX1_ED5C_30	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	ATGACTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	30
RUNX1_ED5C_29	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGACTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	29
RUNX1_ED5C_28	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	GACTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	28
RUNX1_ED5C_27	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	ACTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	27
RUNX1_ED5C_26	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	CTCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	26
RUNX1_ED5C_25	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TCAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	25
RUNX1_ED5C_24	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	CAAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	24
RUNX1_ED5C_23	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	AAATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	23
RUNX1_ED5C_22	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	AATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	22

【表８３－５】

RUNX1_ED5C_21	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	ATATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	21
RUNX1_ED5C_20	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	20
RUNX1_ED5C_19	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	ATGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	19
RUNX1_ED5C_18	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	18
RUNX1_ED5C_17	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	GCTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	17
RUNX1_ED5C_16	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	CTGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	16
RUNX1_ED5C_15	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	15
RUNX1_ED5C_14	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	GTCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	14
RUNX1_ED5C_13	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TCTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	13
RUNX1_ED5C_12	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	CTGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	12
RUNX1_ED5C_11	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	TGAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	11
RUNX1_ED5C_10	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	GAAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	10
RUNX1_ED5C_9	GCATTTTCAGGAGGAAGCGA	AAGCAATCGCTTCCTCCTGAAAAT	15	9

【１２１６】

表3N:図48A～48C PEgRNA

【表８４】

PEGRNA	スペーサー配列	3’伸長配列	PBS長(NT)	RT鋳型長(NT)
HEK3_ED6_5GTOA	GGCCCAGACTGAGCACGTGA(配列番号393)	TCTGCTATCACGTGCTCAGTCTG(配列番号394)	13	10

【１２１７】

表3O:図48A～48Cニックを入れるsgRNA

【表８５】

ニックを入れるSGRNA	スペーサー配列
HEK3_ED6_+63	GCACATACTAGCCCCTGTCT(配列番号395)

【１２１８】

表３P:図５０Ａ～５０Ｂ ＰＲｇＲＮＡ
【表８６－１】

PEG RNA	スペーサー(配列番号 3699-3754)	3'伸長 (5'→3')(配列番号 3755-3810)	PBS 長 (NT)	RT 鋳型長 (NT)
HBB 3.5	GTAACGGCAGAC TTCTCCAC	AGACTTCTCCTCAGGAGTCAGGT GCAC	12	14
HBB 3.7	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	AGACTTCTCTTCAGGAGTCAGGT GCAC	13	14
HBB 5.2	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	TAACGGCAGACTTCTCCTCAGGA GTCAGGTGCAC	13	19
HBB 5.3	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	ACGGCAGACTTCTCCTCAGGAGT CAGGTGCAC	13	17
HBB 5.4	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GGCAGACTTCTCCTCAGGAGTCA GGTGCAC	13	16
HBB 5.5	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GCAGACTTCTCCTCAGGAGTCAG GTGCAC	13	13
HBB 5.6	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTG CAC	13	12
HBB 5.7	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	ACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTGC AC	13	21
HBB 5.8	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	TAACGGCAGACTTCTCCTCAGGA GTCAGGTGCA	12	19
HBB 5.9	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	ACGGCAGACTTCTCCTCAGGAGT CAGGTGCA	12	17
HBB 5.10	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GGCAGACTTCTCCTCAGGAGTCA GGTGCA	12	16
HBB 5.11	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GCAGACTTCTCCTCAGGAGTCAG GTGCA	12	13
HBB 5.12	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	GACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTG CA	12	12
HBB 5.13	GCATGGTGCACCT GACTCCTG	ACTTCTCCTCAGGAGTCAGGTGC A	12	14
HEX AS 1	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ATATCTTATGGCCCTGACTGGAA	13	14
HEX AS 2	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TATATCTTATGGCCCTGACTGGAA	13	15
HEX AS 3	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GTATATCTTATGGCCCTGACTGGA A	13	16
HEX AS 4	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ACCGTATATCTTATGGCCCTGACT GGAA	13	19

【表８６－２】

HEX AS 5	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	AACCGTATATCTTATGGCCCTGAC TGGAA	13	20
HEX AS 6	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GAACCGTATATCTTATGGCCCTGA CTGGAA	13	21
HEX AS 7	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGGAA	13	22
HEX AS 8	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ATATCTTATGGCCCTGACT	9	14
HEX AS 9	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TATATCTTATGGCCCTGACT	9	15
HEX AS 10	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GTATATCTTATGGCCCTGACT	9	16
HEX AS 11	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ACCGTATATCTTATGGCCCTGACT	9	19
HEX AS 12	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	AACCGTATATCTTATGGCCCTGAC T	9	20
HEX AS 13	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GAACCGTATATCTTATGGCCCTGA CT	9	21
HEX AS 14	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACT	9	22
HEX AS 15	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG AC	8	22
HEX AS 16	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTG	10	22
HEX AS 17	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGG	11	22
HEX AS 18	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGGA	12	22
HEX AS 19	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGGAA	13	22
HEX AS 20	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGGAAG	14	22
HEX AS 21	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGAACCGTATATCTTATGGCCCTG ACTGGAAGG	15	22
HEX AS 22	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCTTATGGCC CTGACT	9	25
HEX AS 23	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TACCTGAACCGTATATCTTATGGC CCTGACT	9	26
HEX AS 24	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GTACCTGAACCGTATATCTTATGG CCCTGACT	9	27
HEX AS 25	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	GGTACCTGAACCGTATATCTTATG GCCCTGACT	9	28
HEX AS 26	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	TGGTACCTGAACCGTATATCTTAT GGCCCTGACT	9	29
HEX A 5	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCC CTGACTGGAA	13	21
HEX A 6	ATCCTTCCAGTCA GGGCCAT	ACCGTATATCCTATGGCCCTGACT GGAA	13	15

【表８７】

HEXA 7	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAAGG	15	21
HEXA 8	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAAG	14	21
HEXA 9	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGA	12	21
HEXA 10	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGG	11	21
HEXA 11	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	ACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	21
HEXA 12	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	AACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAA	13	16
HEXA 13	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAA	13	18
HEXA 14	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAA	13	22
HEXA 15	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TGGTACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAA	13	25
HEXA 16	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	GTACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTGGAA	13	23
HEXA 17	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	AACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	16
HEXA 18	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	18
HEXA 19	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	22
HEXA 20	ATCCTTCCAGTCAGGGCCAT	TGGTACCTGAACCGTATATCCTATGGCCCTGACTG	10	25

【１２１９】

表３Ｑ:図５０Ａ～５０Ｂニックを入れるｓｇＲＮＡ

【表８８】

ニックを入れる SGRNA	スペーサー配列
*HBB*_ED7A_+72	GCCTTGATACCAACCTGCCCA(配列番号 626)
*HEXA*_ED7B_+60	GCTGGAACTGGTCACCAAGGC(配列番号 627)
*HEXA*_ED7B_CORRECT_WT_PE3B	GTACCTGAACCGTATATCCTA(配列番号 628)
*HEXA*_ED7B_CORRECT_SILENT_PE3B	GTACCTGAACCGTATATCTTA(配列番号 629)

【１２２０】

表３Ｒ:図５１Ａ～５１Ｇ ＰＥｇＲＮＡ

【表８９－１】

PEGRNA	スペーサー配列 (配列番号 632-640)	3'伸長 (配列番号 641-649)	PBS 長 (NT)	RT 鋳型長 (NT)

【表８９－２】

HEK3_ED8_1TTOG	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCCCGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_ED8_3ATOC	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCAGCACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_ED8_3ATOT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCAACACGTGCTCAGTCTG	13	10
HEK3_ED8_3ATOT_5-6GGTOTT	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGAAAACACGTGCTCAGTCTG	13	34
HEK3_ED8_1CTTINS	GGCCCAGACTGAGCACGTGA	TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG	13	10
RNF2_ED8_1CTOA	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCATGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_ED8_1CTOG	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCACGTAATGACTAAGATG	15	14
RNF2_ED8_1GTAINS	GTCATCTTAGTCATTACCTG	AACGAACACCTCAGTACGTAATGACTAAGATG	15	17
*HBB*_ED8_4ATOT	GCATGGTGCACCTGACTCCTG	AGACTTCTCCACAGGAGTCAGGTGCAC	13	14

【１２２１】

表4:哺乳動物細胞ゲノムDNA増幅およびHTS[181]に使用されたプライマーの配列。

【表９０－１】

説明	配列(配列番号3811～3863)
HEK3 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATGTGGGCTGCCTAGAAAGG
HEK3 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAGCCAAACTTGTCAACC
RNF2 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACGTCTCATATGCCCCTTGG
RNF2 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGTAGGAATTTTGGTGGGACA
HEK4 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGAACCCAGGTAGCCAGAGAC
HEK4 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTTTCAACCCGAACGGAG
EMX1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCAGCTCAGCCTGAGTGTTGA
EMX1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCGTGGGTTTGTGGTTGC
FANCF FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCATTGCAGAGAGGCGTATCA
FANCF REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGGTCCCAGGTGCTGAC

【表９０－２】

HBB FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAGGGTTGGCCAATCTACTCCC
HBB REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCTTCTCTGTCTCCACATGCC
PRNP FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTCAGTGGAACAAGCCGAGT
PRNP REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGGTTGGGGTAACGGTG
HEXA FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCATACAGGTGTGGCGAGAGG
HEXA REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAGCCTCCTTTGGTTAGCA
RUNX1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCACAAACAAGACAGGGAACTG
RUNX1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGATGTAGGGCTAGAGGGGTG
VEGFA FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACTTGGTGCCAAATTCTTCTCC
VEGFA REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAAGAGGGAATGGGCTTTGGA
DNMT FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCACAACAGCTTCATGTCAGCC
DNMT REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGTTAATGTTTCCTGATGGTCC
HEK3 オフターゲット部位 1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCCCCTGTTGACCTGGAGAA
HEK3 オフターゲット部位 1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTGTACTTGCCCTGACCA
HEK3 オフターゲット部位 2 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTGGTGTTGACAGGGAGCAA
HEK3 オフターゲット部位 2 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGAGATGTGGGCAGAAGGG
HEK3 オフターゲット部位 3 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTGAGAGGGAACAGAAGGGCT
HEK3 オフターゲット部位 3 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCAAAGGCCCAAGAACCT
HEK3 オフターゲット部位 4 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCCTAGCACTTTGGAAGGTCG
HEK3 オフターゲット部位 4 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCATCTTAATCTGCTCAGCC
HEK4 オフターゲット部位 1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGGCATGGCTTCTGAGACTCA
HEK4 オフターゲット部位 1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCTCCCTTGCACTCCCTGTCTTT
HEK4 オフターゲット部位 2 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTTGGCAATGGAGGCATTGG
HEK4 オフターゲット部位 2 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAGAGGCTGCCCATGAGAG
HEK4 オフターゲット部位 3 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGGTCTGAGGCTCGAATCCTG
HEK4 オフターゲット部位 3 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGGCCTCCATATCCCTG
HEK4 オフターゲット部位 4 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTTCCACCAGAACTCAGCCC
HEK4 オフターゲット部位 4 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTCGGTTCCTCCACAACAC

【表９０－３】

EMX1 オフターゲット部位 1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTGGGGAGATTTGCATCTGTGGAGG
EMX1 オフターゲット部位 1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTTTTATACCATCTTGGGGTTACAG
EMX1 オフターゲット部位 2 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCAATGTGCTTCAACCCATCACGGC
EMX1 オフターゲット部位 2 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATGAATTTGTGATGGATGCAGTCTG
EMX1 オフターゲット部位 3 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGAGAAGGAGGTGCAGGAGCTAGAC
EMX1 オフターゲット部位 3 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATCCCGACCTTCATCCCTCCTGG
EMX1 オフターゲット部位 4 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTAGTTCTGACATTCCTCCCTGAGGG
EMX1 オフターゲット部位 4 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAACAAGGTGCAGATACAGCA
FANCF オフターゲット部位 1 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCGGGCAGTGGCGTCTTAGTCG
FANCF オフターゲット部位 1 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCTGGGTTTGGTTGGCTGCTC
FANCF オフターゲット部位 2 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCTCCTTGCCGCCCAGCCGGTC
FANCF オフターゲット部位 2 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTGGGGAAGAGGCGAGGACAC
FANCF オフターゲット部位 3 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCCAGTGTTTCCCATCCCCAACAC
FANCF オフターゲット部位 3 REV	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATGGATCCCCCCCTAGAGCTC
FANCF オフターゲット部位 4 FWD	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCAGGCCCACAGGTCCTTCTGGA

【１２２２】

表5:HDR実験におよびHBB E6V HEK293T細胞株の生出に用いられた100mer一本鎖DNAオリゴヌクレオチドドナー鋳型の配列。オリゴヌクレオチドは長さが100～103ntであり、編集の部位を中心とした相同アームを有する。オリゴヌクレオチドはIntegrated DNA Technologiesからであり、PAGEによって精製された。

【表９１－１】

HEK3 +3 A→T	GCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACGTGTTGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGGCGTCGCAGGAC(配列番号 717)
HEK3 +3 A→T、+5,6 GG→TT	GCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAGCACGTGTTTTCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGGCGTCGCAGGAC(配列番号 718)

【表９１－２】

HEK3 +1 T→G	GCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAG CACGGGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGGCGT CGCAGGAC(配列番号 719)
HEK3 +3 A→C	GCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAG CACGTGCTGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGGCGT CGCAGGAC(配列番号 720)
HEK3 +1 CTT 挿入	GCTTCTCCAGCCCTGGCCTGGGTCAATCCTTGGGGCCCAGACTGAG CACGCTTTGATGGCAGAGGAAAGGAAGCCCTGCTTCCTCCAGAGGG CGTCGCAGGAC(配列番号 721)
RNF2 +1 C→A	CCCAGTTTACACGTCTCATATGCCCCTTGGCAGTCATCTTAGTCATT ACATGAGGTGTTCGTTGTAACTCATATAAACTGAGTTCCCATGTTTTG CTTAA(配列番号 722)
RNF2 +1 C→G	CCCAGTTTACACGTCTCATATGCCCCTTGGCAGTCATCTTAGTCATT ACGTGAGGTGTTCGTTGTAACTCATATAAACTGAGTTCCCATGTTTTG CTTAA(配列番号 723)
RNF2 +1 GTA 挿入	CAGTTTACACGTCTCATATGCCCCTTGGCAGTCATCTTAGTCATTAC GTACTGAGGTGTTCGTTGTAACTCATATAAACTGAGTTCCCATGTTTT GCTTA(配列番号 724)
HBB E6V の組み入れ（また *HBB* E6V HEK293T 細胞株の創出にも使用された）	ACTTCATCCACGTTCACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTT CTCCACAGGAGTCAGATGCACCATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGT GAACAC(配列番号 725)
HBB E6V 訂正プロトスペーサーA	ACTTCATCCACGTTCACCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTT CTCCTCAGGAGTCAGGTGCACCATGGTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGT GAACAC(配列番号 726)
HBB E6V 訂正プロトスペーサーB	GTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCT GAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGG ATGAAGT(配列番号 727)
HBB E6V 訂正プロトスペーサーB、サイレント PAM 突然変異	GTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCT GATGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGA TGAAGT(配列番号 728)
PRNP G127V	CACATGGCTGGTGCTGCAGCAGCTGGGGCAGTGGTGGGGGGCCTTG GCGTCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCCATCATACATTTC GGCAGTG(配列番号 729)

【１２２３】

追加の配列

【１２２４】

本明細書に使用された酵母二重蛍光レポータープラスミドの配列

p425-GFP_停止_mCherry:

【化１８－１】

ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGAT
GGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTAC
TTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATG
GCCAACCTTAGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCAATGTTTTGCTAGATACCCAGA
TCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAG
AAAGAACTATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAA
GTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGA
AGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACTATAACTCTCACAATGTTTA
CATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACAC
AACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT
GGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGACAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTA
TCCAAAGATCCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTG
CTGCTGGTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGCTAGCAACCTGGGTCAA
TCCTTGG**GGCCCAGACTGAGCACGTGA**TGGCAGAGCACAGGAGACGTC*ATGGT*
TTCAAAAGGTGAAGAAGATAATATGGCTATTATTAAAGAATTTATGAGATTTAAAGTTCATA
TGGAAGGTTCAGTTAATGGTCATGAATTTGAAATTGAAGGTGAAGGTGAAGGTAGACCA
TATGAAGGTACTCAAACTGCTAAATTGAAAGTTACTAAAGGTGGTCCATTACCATTTGCTT
GGGATATTTTGTCACCACAATTTATGTATGGTTCAAAAGCTTATGTTAAACATCCAGCTGA
TATTCCAGATTATTTAAAATTGTCATTTCCAGAAGGTTTTAAATGGGAAAGAGTTATGAATT
TTGAAGATGGTGGTGTTGTTACTGTTACTCAAGATTCATCATTACAAGATGGTGAATTTAT
TTATAAAGTTAAATTGAGAGGTACTAATTTTCCATCAGATGGTCCAGTTATGCAAAAAAAA
ACTATGGGTTGGGAAGCTTCATCAGAAAGAATGTATCCAGAAGATGGTGCTTTAAAAGG
TGAAATTAAACAAAGATTGAAATTAAAAGATGGTGGTCATTATGATGCTGAAGTTAAAACT
ACTTATAAAGCTAAAAAACCAGTTCAATTACCAGGTGCTTATAATGTTAATATTAAATTGGA
TATTACTTCACATAATGAAGATTATACTATTGTTGAACAATATGAAAGAGCTGAAGGTAGAC
ATTCAACTGGTGGTATGGATGAATTATATAAAGGTACCGCTCGAGCAGCTGTGATTGATT
*GA*GTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTTAAGTGAATTTACTTTAAATCTTG
CATTTAAATAAATTTTCTTTTTATAGCTTTATGACTTAGTTTCAATTTATATACTATTTT
AATGACATTTTCGATTCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAG
CTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTC
ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAGGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACTCACATT
AATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTG
CATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTT
CCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGT
ATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC

【化１８－２】

GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT
TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA
TACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
GTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAA
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACC
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAG
TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCC
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGT
TAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGT
CGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC
TTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG
GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG
GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCA
TTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTG
AGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAA
GAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTC
AAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCT
ATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTTCTACAAAAATGCATCCCGAGA
GCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTAT
AATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGC
TACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCGTTT
ACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCGATT
ATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGA
TGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATATACT
ACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTTCT
TACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAG
GTCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGG
GATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGC
GGTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAA
AGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTT
CTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGC

【化１８－３】

TTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTCACGTCGCACCT
ATATCTGCGTGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAAGAACGGCATAGTGCGTGTTT
ATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTAC
CTCCTGTGATATTATCCCATTCCATGCGGGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCC
TTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTA
TCATTTCCTTTGATATTGGATCATACTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCG
GGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATCG
ACTACGTCGTAAGGCCGTTTCTGACAGAGTAAAATTCTTGAGGGAACTTTCACCAT
TATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATTGACTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCAT
TGAGTGTTTTTTATTTGTTGTATTTTTTTTTTTTTAGAGAAAATCCTCCAATATCAAA
TTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCTGTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCCCTC
CTCCTTGTCAATATTAATGTTAAAGTGCAATTCTTTTTCCTTATCACGTTGAGCCATT
AGTATCAATTTGCTTACCTGTATTCCTTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAA
ATGTATGTAGATTGCGTATATAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAAT
TTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAA
AAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCG
ACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAA
AACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACA
ATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTT
GGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCT
TGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGA
TAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATAC
CATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGA
TGTTGAACCTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTC
CATAATCTTGAAGAGGCCAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGG
TGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTG
GAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCT
TACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTA
GCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTAC
ATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTT
CAGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAAC
GGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGTGGGACACCTGTA
GCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGGA
ACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTGAC
CAACGTGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATAGGGGCAG
ACATTAGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAA
GAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTAACCACCTATTGGAAAAAACAATAGGTC
CTTAAATAATATTGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTTAGTCATGAACGCT
TCTCTATTCTATATGAAAAGCCGGTTCCGGCCTCTCACCTTTCCTTTTTCTCCCAATT
TTTCAGTTGAAAAAGGTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTC
CAGTCATCGAATTTGATTCTGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAG
GAAAAAAATAATGGTTGCTAAGAGATTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGT
ATTCCCACAGTTAACTGCGGTCAAGATATTTCTTGAATCAGGCGCCTTAGACCGCT
CGGCCAAACAACCAATTACTTGTTGAGAAATAGAGTATAATTATCCTATAAATATAA
CGTTTTTGAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAAT
GTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTTAATAAGGCAATAATATTAGGTAT

【化１８－４】

GTGGATATACTAGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACA
GATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAA
AATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCG
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGA
AAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTT
TTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGA
TTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAA
AGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT
AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCGCGCCATTCG
CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATAC
GACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCG
ATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCGTTAGAATCATTTTGAATA
AAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGAAT
ACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTT
TTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATAT
ATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATG
GAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATA
TTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAG
AACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAA
CCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCA
TTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAA
AAGGTTGAAACCAGTTCCCTGAAATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAG
ACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACT
TTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAAC
ACACATAAACAAACAAAGAATTC (配列番号 730)

【化１９－１】

p425-GFP_+1fs_mCherry:

ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGAT
GGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTAC
TTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATG
GCCAACCTTAGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCAATGTTTTGCTAGATACCCAGA
TCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAG
AAAGAACTATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAA
GTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGA
AGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACTATAACTCTCACAATGTTTA
CATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACAC
AACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT
GGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGACAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTA
TCCAAAGATCCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTG
CTGCTGGTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGCTAGCAAACCTGGGTCA
ATCCTTGG**GGCCCAGACTGAGCACGTGA**TGGCAGAGCACAGGAGACGTC*ATGG*
TTTCAAAAGGTGAAGAAGATAATATGGCTATTATTAAAGAATTTATGAGATTTAAAGTTCAT
ATGGAAGGTTCAGTTAATGGTCATGAATTTGAAATTGAAGGTGAAGGTGAAGGTAGACC
ATATGAAGGTACTCAAACTGCTAAATTGAAAGTTACTAAAGGTGGTCCATTACCATTTGCT
TGGGATATTTTGTCACCACAATTTATGTATGGTTCAAAAGCTTATGTTAAACATCCAGCTG
ATATTCCAGATTATTTAAAATTGTCATTTCCAGAAGGTTTTAAATGGGAAAGAGTTATGAAT

【化１９－２】

TTTGAAGATGGTGGTGTTGTTACTGTTACTCAAGATTCATCATTACAAGATGGTGAATTTA
TTTATAAAGTTAAATTGAGAGGTACTAATTTTCCATCAGATGGTCCAGTTATGCAAAAAAA
AACTATGGGTTGGGAAGCTTCATCAGAAAGAATGTATCCAGAAGATGGTGCTTTAAAAG
GTGAAATTAAACAAAGATTGAAATTAAAAGATGGTGGTCATTATGATGCTGAAGTTAAAAC
TACTTATAAAGCTAAAAAACCAGTTCAATTACCAGGTGCTTATAATGTTAATATTAAATTGG
ATATTACTTCACATAATGAAGATTATACTATTGTTGAACAATATGAAAGAGCTGAAGGTAGA
CATTCAACTGGTGGTATGGATGAATTATATAAAGGTACCGCTCGAGCAGCTGTGATTGAT
*TGA*GTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTTAAGTGAATTTACTTTAAATCTT
GCATTTAAATAAATTTTCTTTTTATAGCTTTATGACTTAGTTTCAATTTATATACTATT
TTAATGACATTTTCGATTCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGG
AGCTCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG
GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAGG
AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACTCACA
TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCT
GCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCT
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGG
TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATC
GACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGT
TTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA
TACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC
CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTG
GTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
TCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAA
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACC
AATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAG
TTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
AATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCC
GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGT
TAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGT
CGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAG
AAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTC
TTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAG
TCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG
GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTT
CTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGG
TTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGG

【化１９－３】

GGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCA
TTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTG
AGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAA
GAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTC
AAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCT
ATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTTCTACAAAAATGCATCCCGAGA
GCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTAT
AATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGC
TACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCGTTT
ACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCGATT
ATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGA
TGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATATACT
ACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTTCT
TACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAG
GTCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGG
GATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGC
GGTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAA
AGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTT
CTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGC
TTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTCACGTCGCACCT
ATATCTGCGTGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAAGAACGGCATAGTGCGTGTTT
ATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTAC
CTCCTGTGATATTATCCCATTCCATGCGGGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCC
TTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTA
TCATTTCCTTTGATATTGGATCATACTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCG
GGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATCG
ACTACGTCGTAAGGCCGTTTCTGACAGAGTAAAATTCTTGAGGGAACTTTCACCAT
TATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATTGACTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCAT
TGAGTGTTTTTTATTTGTTGTATTTTTTTTTTTTTAGAGAAAATCCTCCAATATCAAA
TTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCTGTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCCCTC
CTCCTTGTCAATATTAATGTTAAAGTGCAATTCTTTTTCCTTATCACGTTGAGCCATT
AGTATCAATTTGCTTACCTGTATTCCTTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAA
ATGTATGTAGATTGCGTATATAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAAT
TTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAA
AAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCG
ACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAA
AACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACA
ATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTT
GGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCT
TGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGA
TAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATAC
CATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGA
TGTTGAACCTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTC
CATAATCTTGAAGAGGCCAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGG
TGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTG
GAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCT

【化１９－４】

TACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTA
GCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTAC
ATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTT
CAGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAAC
GGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGTGGGACACCTGTA
GCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGGA
ACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTGAC
CAACGTGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATAGGGGCAG
ACATTAGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAA
GAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTAACCACCTATTGGAAAAAACAATAGGTC
CTTAAATAATATTGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTTAGTCATGAACGCT
TCTCTATTCTATATGAAAAGCCGGTTCCGGCCTCTCACCTTTCCTTTTTCTCCCAATT
TTTCAGTTGAAAAAGGTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTC
CAGTCATCGAATTTGATTCTGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAG
GAAAAAAATAATGGTTGCTAAGAGATTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGT
ATTCCCACAGTTAACTGCGGTCAAGATATTTCTTGAATCAGGCGCCTTAGACCGCT
CGGCCAAACAACCAATTACTTGTTGAGAAATAGAGTATAATTATCCTATAAATATAA
CGTTTTTGAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAAT
GTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTTAATAAGGCAATAATATTAGGTAT
GTGGATATACTAGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACA
GATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAA
AATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCG
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGA
AAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTT
TTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGA
TTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAA
AGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT
AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCGCGCCATTCG
CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATAC
GACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCG
ATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCGTTAGAATCATTTTGAATA
AAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGAAT
ACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTT
TTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATAT
ATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATG
GAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATA
TTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAG
AACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAA
CCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCA
TTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAA
AAGGTTGAAACCAGTTCCCTGAAATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAG
ACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACT
TTTATAGTTAGTCTTTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAAC
ACACATAAACAAACAAAGAATTC (配列番号 731)

【化２０－１】

p425-GFP_-1fs_mCherry:

【化２０－２】

ATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTCACTGGTGTTGTCCCAATTTTGGTTGAATTAGAT
GGTGATGTTAATGGTCACAAATTTTCTGTCTCCGGTGAAGGTGAAGGTGATGCTAC
TTACGGTAAATTGACCTTAAAATTTATTTGTACTACTGGTAAATTGCCAGTTCCATG
GCCAACCTTAGTCACTACTTTCGGTTATGGTGTTCAATGTTTTGCTAGATACCCAGA
TCATATGAAACAACATGACTTTTTCAAGTCTGCCATGCCAGAAGGTTATGTTCAAG
AAAGAACTATTTTTTTCAAAGATGACGGTAACTACAAGACCAGAGCTGAAGTCAA
GTTTGAAGGTGATACCTTAGTTAATAGAATCGAATTAAAAGGTATTGATTTTAAAGA
AGATGGTAACATTTTAGGTCACAAATTGGAATACAACTATAACTCTCACAATGTTTA
CATCATGGCTGACAAACAAAAGAATGGTATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACAC
AACATTGAAGATGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCATTATCAACAAAATACTCCAATT
GGTGATGGTCCAGTCTTGTTACCAGACAACCATTACTTATCCACTCAATCTGCCTTA
TCCAAAGATCCAAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTGTTAGAATTTGTTACTG
CTGCTGGTATTACCCATGGTATGGATGAATTGTACAAAGCTAGCAAACCTGGGTCA
ATCCTTGG**<u>GGCCCAGACTGAGCACGTGA</u>ATGG**CAGAGCACAGGACGTC*ATGGTTT*
CAAAAGGTGAAGAAGATAATATGGCTATTATTAAAGAATTTATGAGATTTAAAGTTCATATG
GAAGGTTCAGTTAATGGTCATGAATTTGAAATTGAAGGTGAAGGTGAAGGTAGACCATAT
GAAGGTACTCAAACTGCTAAATTGAAAGTTACTAAAGGTGGTCCATTACCATTTGCTTGG
GATATTTTGTCACCACAATTTATGTATGGTTCAAAAGCTTATGTTAAACATCCAGCTGATAT
TCCAGATTATTTAAAATTGTCATTTCCAGAAGGTTTTAAATGGGAAAGAGTTATGAATTTT
GAAGATGGTGGTGTTGTTACTGTTACTCAAGATTCATCATTACAAGATGGTGAATTTATTT
ATAAAGTTAAATTGAGAGGTACTAATTTTCCATCAGATGGTCCAGTTATGCAAAAAAAAAC
TATGGGTTGGGAAGCTTCATCAGAAAGAATGTATCCAGAAGATGGTGCTTTAAAAGGTG
AAATTAAACAAAGATTGAAATTAAAAGATGGTGGTCATTATGATGCTGAAGTTAAAACTAC
TTATAAAGCTAAAAAACCAGTTCAATTACCAGGTGCTTATAATGTTAATATTAAATTGGATAT
TACTTCACATAATGAAGATTATACTATTGTTGAACAATATGAAAGAGCTGAAGGTAGACAT
TCAACTGGTGGTATGGATGAATTATATAAAGGTACCGCTCGAGCAGCTGTGATTGATTGA
GTCGACTTGGTTGAACACGTTGCCAAGGCTTAAGTGAATTTACTTTAAATCTTGCA
TTTAAATAAATTTTCTTTTTATAGCTTTATGACTTAGTTTCAATTTATATACTATTTTA
ATGACATTTTCGATTCGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGC
TCCAGCTTTTGTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCA
TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAGGAGC
CGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACTCACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGC
ATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTC
CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTAT
CAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGG
AAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
CGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGA
CGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTC
CCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAG
GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
CCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGA
GCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC
TTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGG

【化２０－３】

ATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTT
GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
CAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCG
CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTT
AATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTC
GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
CCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGA
AGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC
ATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCT
TCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAC
CCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGG
TGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACG
GAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT
TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATT
TTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAG
CTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGA
ATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAA
ACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTAT
TTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTTCTACAAAAATGCATCCCGAGAGC
GCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAA
TGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGCTA
CTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCGTTTAC
TGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCGATTATA
TTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGATG
ATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATATACTAC
GTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTTCTTA
CTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAGG
TCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGG
ATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCG
GTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAAA
GTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTTC
TAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGCT
TCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTCACGTCGCACCTA
TATCTGCGTGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAAGAACGGCATAGTGCGTGTTTA
TGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTAC
CTCCTGTGATATTATCCCATTCCATGCGGGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCC
TTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTA
TCATTTCCTTTGATATTGGATCATACTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTA
TAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTG
AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCG
GGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATCG
ACTACGTCGTAAGGCCGTTTCTGACAGAGTAAAATTCTTGAGGGAACTTTCACCAT

【化２０－４】

TATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATTGACTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCAT
TGAGTGTTTTTTATTTGTTGTATTTTTTTTTTTTTAGAGAAAATCCTCCAATATCAAA
TTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCTGTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCCCTC
CTCCTTGTCAATATTAATGTTAAAGTGCAATTCTTTTTCCTTATCACGTTGAGCCATT
AGTATCAATTTGCTTACCTGTATTCCTTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAA
ATGTATGTAGATTGCGTATATAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAAT
TTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAA
AAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCG
ACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAA
AACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACA
ATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTT
GGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCT
TGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGA
TAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATAC
CATTTAGGTGGGTTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGA
TGTTGAACCTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTC
CATAATCTTGAAGAGGCCAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGG
TGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTG
GAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCT
TACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTA
GCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTAC
ATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTT
CAGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAAC
GGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGTGGGACACCTGTA
GCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGGA
ACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTGAC
CAACGTGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATAGGGGCAG
ACATTAGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAA
GAAAAGTTAGAAAGTAAGACGATTGCTAACCACCTATTGGAAAAAACAATAGGTC
CTTAAATAATATTGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTTAGTCATGAACGCT
TCTCTATTCTATATGAAAAGCCGGTTCCGGCCTCTCACCTTTCCTTTTTCTCCCAATT
TTTCAGTTGAAAAAGGTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTC
CAGTCATCGAATTTGATTCTGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAG
GAAAAAAATAATGGTTGCTAAGAGATTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGT
ATTCCCACAGTTAACTGCGGTCAAGATATTTCTTGAATCAGGCGCCTTAGACCGCT
CGGCCAAACAACCAATTACTTGTTGAGAAATAGAGTATAATTATCCTATAAATATAA
CGTTTTTGAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAAT
GTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTTAATAAGGCAATAATATTAGGTAT
GTGGATATACTAGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACA
GATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAA
AATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCG
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCA
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGA
AAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTT
TTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGA
TTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAA
AGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT
AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCGCGCCATTCG
CCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT

【化２０－５】

TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATAC
GACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCG
ATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCGTTAGAATCATTTTGAATA
AAAAACACGCTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGAAT
ACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTT
TTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATAT
ATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATG
GAGCCCGCTTTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATA
TTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAG
AACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAA
CCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCA
TTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAA
AAGGTTGAAACCAGTTCCCTGAAATTATTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAG
ACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACT
TTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAAC
ACACATAAACAAACAAAGAATTC (配列番号 732)

凡例 ：
GFP オープンリーディングフレーム
停止コドン含有リンカー＋1フレームシフト、または－1フレームシフト
mCherry オープンリーディングフレーム
プラスミド骨格 (GPDプロモーター、Leu2マーカー、およびAmpRを含有する)
プロトスペーサ (下線)
PAM (太字)

【１２２５】
哺乳動物プライム編集因子プラスミドおよび例となるPEgRNAプラスミドのDNA配列

【化２１－１】

pCMV-PE1:

ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAA
AGTCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGG
GCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGC
AACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGAC
AGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATA
CACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATG
GCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAA
GAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTG
GCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACA
GCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAA
GTTCCGGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGT
GGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAAC
CCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCA
AGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATG
GCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAG
CAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGA
CGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTT
CTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGA
ACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGA
GCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGA

【化２１－２】

GAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATT
GACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAA
AAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTG
CGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGA
GAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACA
ACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCC
TCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAAC
CATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAG
CTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAG
TGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGA
AAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTC
CGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAA
ATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAG
ATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCT
GAAAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCG
GAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGA
CAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAAC
AGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCC
AGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCT
GGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGA
CGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAAT
GGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAA
TGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAAC
ACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA
GAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGAC
TACGATGTGGACGCTATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACA
ACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCC
TCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCC
AAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGC
CTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGG
CAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACG
ACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGC
TGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAA
CTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACG
ACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCA
AGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAG
ATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGC
CCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAG
AGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACT
GGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCT
GGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAG
AGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGA
CTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCT
GCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAAC

【化２１－３】

TTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATG
AGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAA
AGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGA
GAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGT
ACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGG
ACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCT
GTCTCAGCTGGGAGGTGAC*TCTGGAGGATCTAGCGGAGGATCCTCTGGCAGCGAGA*
CACCAGGAACAAGCGAGTCAGCAACACCAGAGAGCAGTGGCGGCAGCAGCGGCGGC
*AGCAGC***ACCCTAAATATAGAAGATGAGTATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGA**
GCCAGATGTTTCTCTAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCCTCAGGCCTGG
GCGGAAACCGGGGGCATGGGACTGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATA
CCTCTGAAAGCAACCTCTACCCCCGTGTCCATAAAACAATACCCCATGTCACA
AGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGACTGTTGGACCAGGG
AATACTGGTACCCTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCCCTGCTACCCGTTAAG
AAACCAGGGACTAATGATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCAACA
AGCGGGTGGAAGACATCCACCCCACCGTGCCCAACCCTTACAACCTCTTGAG
CGGGCTCCCACCGTCCCACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCC
TTTTTCTGCCTGAGACTCCACCCCACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGT
GGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAATTGACCTGGACCAGACTCC
CACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTGATGAGGCACTGCACAGAGA
CCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTACGTG
GATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAAGGTACTC
GGGCCCTGTTACAAACCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCTCGGCCAAGA
AAGCCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAAGA
GGGTCAGAGATGGCTGACTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCC
TACTCCGAAGACCCCTCGACAACTAAGGGAGTTCCTAGGGACGGCAGGCTT
CTGTCGCCTCTGGATCCCTGGGTTTGCAGAAATGGCAGCCCCCCTGTACCCT
CTCACCAAAACGGGGACTCTGTTTAATTGGGGCCCAGACCAACAAAAGGCCT
ATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAGA
TTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAA
GGTGTCCTAACGCAAAAACTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTG
TCCAAAAAGCTAGACCCAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGG
TAGCAGCCATTGCCGTACTGACAAAGGATGCAGGCAAGCTAACCATGGGACA
GCCACTAGTCATTCTGGCCCCCCATGCAGTAGAGGCACTAGTCAAACAACCC
CCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCCGGATGACTCACTATCAGGCCTTGCTTT
TGGACACGGACCGGGTCCAGTTCGGACCGGTGGTAGCCCTGAACCCGGCTA
CGCTGCTCCCACTGCCTGAGGAAGGGCTGCAACACAACTGCCTTGATATCCT
GGCCGAAGCCCACGGAACCCGACCCGACCTAACGGACCAGCCGCTCCCAGA
CGCCGACCACACCTGGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTACAAGAGGGACA
GCGTAAGGCGGGAGCTGCGGTGACCACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAA
AGCCCTGCCAGCCGGGACATCCGCTCAGCGGGCTGAACTGATAGCACTCAC
CCAGGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAATGTTTATACTGATAGC
CGTTATGCTTTTGCTACTGCCCATATCCATGGAGAAATATACAGAAGGCGTGG
GTTGCTCACATCAGAAGGCAAAGAGATCAAAAATAAAGACGAGATCTTGGCC
CTACTAAAAGCCCTCTTTCTGCCCAAAAGACTTAGCATAATCCATTGTCCAGG
ACATCAAAAGGGACACAGCGCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGGCTGACCA
AGCGGCCCGAAAGGCAGCCATCACAGAGACTCCAGACACCTCTACCCTCCT
CATAGAAAATTCATCACCCTCTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGC

【化２１－４】

GAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTAACCGGTCATCATCACCATCAC
CATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTG
TCCTTTCCTAATAAAATGAGAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTA
TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATA
GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAG
CTGGGGCTCGATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGA
AGCATAAAGTGTAAAGCCTAGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGC
GTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGA
ACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGC
TGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCT
CAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT
CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAG
ACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGG
TATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAG
AAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC
TTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGG
TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTT
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGAC
TCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA
GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTA
TGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATG
TTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGT
TGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA
TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATAC
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGG
CGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
TGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCGATCTCC
CGATCCCCTAGGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCC
AGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATT
TAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGG

【化２１－５】

TTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGA
TTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
TGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT
GGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAG
TACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC
AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGA
CGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
AACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCT
ATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGAGATCCGCGGCCGCT
AATACGACTCACTATAGGGAGAGCCGCCACC (配列番号 733)

【化２２－１】

pCMV-PE2:

ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAA
AGTCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGG
GCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGC
AACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGAC
AGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATA
CACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATG
GCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGAA
GAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTG
GCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACA
GCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAA
GTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGT
GGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAAC
CCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCA
AGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATG
GCCTGTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAG
CAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGA
CGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTT
CTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGA
ACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGA
GCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGA
GAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATT
GACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAA
AAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTG
CGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGA
GAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACA
ACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCC
TCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAAC
CATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAG
CTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTG
CCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAG
TGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGA
AAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTC
CGGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAA

【化２２－２】

ATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAG
ATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCT
GAAAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCG
GAGATACACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGA
CAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAAC
AGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCC
AGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCT
GGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGA
CGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAAT
GGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAA
TGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAAC
ACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA
GAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGAC
TACGATGTGGACGCTATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACA
ACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCC
TCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCC
AAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGC
CTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGG
CAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACG
ACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGC
TGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAA
CTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACG
ACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCA
AGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAG
ATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGC
CCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAG
AGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACT
GGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCT
GGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAG
AGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGA
CTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCT
GCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAAC
TTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATG
AGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCG
AGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAA
AGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGA
GAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGT
ACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGG
ACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCT
GTCTCAGCTGGGAGGTGACTCTGGAGGATCTAGCGGAGGATCCTCTGGCAGCGAG
ACACCAGGAACAAGCGAGTCAGCAACACCAGAGAGCAGTGGCGGCAGCAGCGG
CGGCAGCAGCACCCTAAATATAGAAGATGAGTATCGGCTACATGAGACCTCAAAA
GAGCCAGATGTTTCTCTAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCCTCAGGCCTGGGC
GGAAACCGGGGGCATGGGACTGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACCTCTG
AAAGCAACCTCTACCCCCGTGTCCATAAAACAATACCCCATGTCACAAGAAGCCA
GACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGACTGTTGGACCAGGGAATACTGGTACC

【化２２－３】

CTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCCCTGCTACCCGTTAAGAAACCAGGGACTAAT
GATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCAACAAGCGGGTGGAAGACATCC
ACCCCACCGTGCCCAACCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCCACCGTCCCACCA
GTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCTTTTTCTGCCTGAGACTCCACCCCA
CCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGG
ACAATTGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTT
AATGAGGCACTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGA
TCCTGCTACAGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGC
CAACAAGGTACTCGGGCCCTGTTACAAACCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCT
CGGCCAAGAAAGCCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCT
AAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGACTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCA
GCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACTAAGGGAGTTCCTAGGGAAGGCAGGCTTC
TGTCGCCTCTTCATCCCTGGGTTTGCAGAAATGGCAGCCCCCCTGTACCCTCTCAC
CAAACCGGGGACTCTGTTTAATTGGGGCCCAGACCAACAAAAGGCCTATCAAGAA
ATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATTTGACTAAGC
CCTTTGAACTCTTTGTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCCTAACGCA
AAAACTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAAGCTAGACCC
AGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCGTACTG
ACAAAGGATGCAGGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCC
ATGCAGTAGAGGCACTAGTCAAACAACCCCCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCCG
GATGACTCACTATCAGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCGGACCG
GTGGTAGCCCTGAACCCGGCTACGCTGCTCCCACTGCCTGAGGAAGGGCTGCAAC
ACAACTGCCTTGATATCCTGGCCGAAGCCCACGGAACCCGACCCGACCTAACGGA
CCAGCCGCTCCCAGACGCCGACCACACCTGGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTA
CAAGAGGGACAGCGTAAGGCGGGAGCTGCGGTGACCACCGAGACCGAGGTAATC
TGGGCTAAAGCCCTGCCAGCCGGGACATCCGCTCAGCGGGCTGAACTGATAGCAC
TCACCCAGGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAATGTTTATACTGATAGC
CGTTATGCTTTTGCTACTGCCCATATCCATGGAGAAATATACAGAAGGCGTGGGTG
GCTCACATCAGAAGGCAAAGAGATCAAAAATAAAGACGAGATCTTGGCCCTACTA
AAAGCCCTCTTTCTGCCCAAAAGACTTAGCATAATCCATTGTCCAGGACATCAAAA
GGGACACAGCGCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGGCTGACCAAGCGGCCCGAAA
GGCAGCCATCACAGAGACTCCAGACACCTCTACCCTCCTCATAGAAAATTCATCAC
CCTCTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGA
AGAGGAAAGTCTAACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGAT
CAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG
CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGAA
AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC
AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
TGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCGATACCGTCGAC
CTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTAG
GGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT
CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG
AGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCG
CTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGG
TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAG
CAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC
GCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT

【化２２－４】

CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTC
GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTT
ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGG
CAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACG
CGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG
CTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG
GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTAT
ATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT
CAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAA
CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA
CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCC
GAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCC
ATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTC
CGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCG
GTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATC
ACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATG
CTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG
AACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGG
ATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC
TTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA
AATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCT
TCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAA
AAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCGATCTCCCGATCCCCTAGGGTC
GACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTG
CTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAG
GCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCG
CTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTAT
TAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTA
CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTG
ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGT
CAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG
TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC
GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG
TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATT
GACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGT
TTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGAGATCCGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAG
GGAGAGCCGCCACC (配列番号 734)

【化２２－５】

N 末端 *NLS + Cas9 H840A*

フレキシブルリンカー

【化２２－６】

M-MLV　逆転写酵素　　＋C　末端　　NLS

プラスミド骨格　（　CMVプロモーターおよびAmpRを含有する　）

【化２３－１】

pU6-HEK3_PEgRNA_CTTins:

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
GAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAAT
GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
TTGTGGAAAGGACGAAACACC*GGCCCAGACTGAGCACGTGA*GTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGGACCGAG
TCGGTCC**TCTGCCATCAAAGCGTGCTCAGTCTG**TTTTTTTAAGCTTGGGCCGCT
CGAGGTACCTCTCTACATATGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA
CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAG
CATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCT
GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGC
TGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG
TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGG
ATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG
TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT
CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTC
CAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
CTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAA
GTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAG
GCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAG
TACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC
CAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGA
ATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGA
AGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAA
AATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCG
CTAGCTGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGG
TACCAAGGTCGGGCAGGAA（　配列番号　735）

【化２３－２】

U6 プロモーター配列

スペーサー配列

【化２３－３】

sgRNA 骨格

3'伸長 (PBSおよびRT鋳型を含有する)

骨格 (AmpRを含有する)

【化２４－１】

pLenti-hSyn-N-PE2-NpuN-P2A-GFP-KASH_U6-DNMT1-PEgRNA:

GTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCT
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTA
GTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCG
TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC
CCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG
GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGCGCGTTTTGCC
TGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGG
GAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCC
GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA
ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGC
GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGT
GCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTT
AAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
CTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAT
ACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATA
ATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGC
GGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT
ATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGT
TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGG
CCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG
GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGA
ATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCT
CTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCT
CTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATT
ACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGA
ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAA
ATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAA
TAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTT
TCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGA
AGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCG
TGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGG
GATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA

【化２４－２】

ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGA
CAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAATTAAGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTAT
TTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAAT
TAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAAT
TTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGT
AACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC**G**
CGGGCTGGAGCTGTTCGCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAAGATGCAAGCGC
GAACAGCTCCAGTTTTTTTGAATTC*AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCG*
GGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCCAT
TCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGC
GTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGC
GCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACTC
CCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCGGCCCAGCCGGACCGCACCAC
GCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACT
CAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG
TCGAGAATCTAGAGCGCTGCCACCATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGT
CACCAAAGAAGAAGCGGAAAGTCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCA
CCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATT
CAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCT
GCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAA
GAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGA
GATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGGA
AGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGC
CTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCAC
CGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGG
GGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTG
TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCA
GCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGG
AAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCGGAAACCTGAT
TGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAT
GCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCC
CAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCA
TCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGC
CTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTC
GTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCA
AGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAG
AGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCC
ACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAA
GGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGC
CCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACC
ATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTC
ATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGC
ACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGT
GACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGT
GGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTA
CTTCAAGAAAATCGAG*TGCCTGTCCTACGAGACAGAGATCCTGACAGTGGAGTATGGCCT*
GCTGCCAATCGGCAAGATCGTGGAGAAGAGGATCGAGTGTACCGTGTACTCTGTGGATAAC

【化２４－３】

AATGGCAACATCTATACACAGCCCGTGGCACAGTGGCACGATAGGGGAGAGCAGGAGGTGT
TCGAGTATTGCCTGGAGGACGGCAGCCTGATCAGGGCAACCAAGGACCACAAGTTCATGAC
AGTGGATGGCCAGATGCTGCCCATCGACGAGATTTTCGAGCGGGAGCTGGACCTGATGAGA
GTGGATAACCTGCCTAATAGCGGAGGCAGTAAAAGAACAGCAGACGGGAGTGAGTTTGA
GCCCAAGAAAAAGAGAAAGGTGGGATCCGGCGCAACAAACTTCTCTCTGCTGAAACAA
GCCGGAGATGTCGAAGAGAATCCTGGACCGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG
GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
ACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGT
GCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA
TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG
ACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAAC
AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAA
GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC
CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTCG
AGAGGAGGAGGAGGAGACAGACAGCAGGATGCCCCACCTCGACAGCCCCGGCAGCTCC
CAGCCGAGACGCTCCTTCCTCTCAAGGGTGATCAGGGCAGCGCTACCGTTGCAGCTGCT
TCTGCTGCTGCTGCTGCTCCTGGCCTGCCTGCTACCTGCCTCTGAAGATGACTACAGCT
GCACCCAGGCCAACAACTTTGCCCGATCCTTCTACCCCATGCTGCGGTACACCAACGGG
*CCACCTCCCACCTAA*ACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGA
AAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
ATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC
CTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCT
CCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCT
GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTT
GTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGC
GGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC
GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCGTCGACTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCA
GCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACT
CCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATC
TGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT
TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGA
TCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGGGCCCGTTTAAACCCGCT
GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG
CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA
GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTAT
GGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGT
AGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCC
GGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTT
ACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
CCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT
CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGG

50

【化２４－４】

GATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC
GAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTC
CCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACC
ATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTC
TCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTC
TGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAG
CTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCAT
CGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAG
TTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCT
GGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGT
CCGGGACGACGTGACCCTGTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAA
CACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGA
GGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGA
GCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTT
CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTC
TATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCG
CGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG
TTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTC
TAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCT
AGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTC
ACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAAT
GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAAC
CTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTA
TTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGG
CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC
CCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTC
CGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCA
GTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCC
CGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACT
TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTG
GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGC
GCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCC
AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGC
AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTC
GCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCT
CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGA
TCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAG
TAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGT

【化２４－５】

CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAG
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
CCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC
TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
TGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGC
AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTT
CCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGT
GCCACCTGAC (配列番号 736)

U6プロモーター
PEgRNA
hSynプロモーター
N 末端 PE2
N 末端 Npu
P2A-GFP-KASH

【化２５－１】

pLenti-hSyn-C-PE2-NpuC:

GTCGACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCT
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTA
GTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAG
AATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCG
TTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC
CCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG
GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC
CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG
ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTG
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGCGCGTTTTGCC
TGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGG
GAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCC
GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA
ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGC
GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGT
GCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTT
AAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
CTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAT
ACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATA
ATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGC
GGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT
ATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGT
TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGG
CCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG

【化２５－２】

GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGA
ATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCT
CTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCT
CTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATT
ACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGA
ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAA
ATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAA
TAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTT
TCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGA
AGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCGGCACTGCG
TGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGG
GATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA
ACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGA
CAGCAGAGATCCAGTTTGGTTAATTAAGGTACCAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGG
ATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCAC
CCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGA
TGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCC
CGCCTGGCGGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCG
CCGGTCCCCCGCAAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCGG
CCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCT
GCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGT
CGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAG*TCGAGAATCTAGAGCGCTGCCACCATGAAACGGACAGC*
*CGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAAAGTC*ATCAAGATTGCTACACGG
AAATACCTGGGAAAGCAGAACGTGTACGACATCGGCGTGGAGCGGGATCACAACTTCGCCC
*TGAAGAATGGCTTTATCGCCAGCAAT***TGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGA**
AGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAG
GACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTG
CTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACC
TATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCA
GTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAA
CTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAA
GCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCC
GGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAG
CTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCC
AGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAA
GCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCC
CGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAA
TGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTA
CGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAAC
AAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTC
CGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAA
GCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCT
GAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCA
GATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGA
CGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCT
GGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAACAAC
TACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATC
AAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTAC

【化２５－３】

GACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCC
AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGC
CAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGG
AGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCA
TGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCA
AAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGG
ACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTG
TGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCC
ATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCA
AGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGG
CCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATG
TGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGG
ATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGAT
CATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTG
GACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAG
GCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCT
TCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGG
TGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGA
TCGACCTGTCTCAGCTGGGAGGTGACTCTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACG
GCAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTAAACGCGTTAAGTCGACAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCC
TTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATG
GCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG
CCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTG
GTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT
ATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGC
TGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTG
CTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGC
CCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGC
GTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCGTCGA
CTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAG
GGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTA
CTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAA
CCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTC
TGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC
CATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
CTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG
GCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGC
TCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGG
TTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC
TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCT
CCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGG
GTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG
GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTAT
CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAAT
GAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGG

【化２５－４】

TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT
AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA
GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC
CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATG
CAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTT
TGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTG
ATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAA
GGTGAGGAACTAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGC
GACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCG
TGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTCATCAGCGCGGT
CCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGA
CGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGG
GCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGA
CCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTGCTACG
AGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGG
ACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCC
AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACA
AATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCT
TATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT
AAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT
CACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA
ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCG
CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGAC
AGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTC
CGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTT
TCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTT
CGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGG
TTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCT
TTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTT
GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAG
TGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
CGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTT
GCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT
GCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC
CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTAT
GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG
TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC

【化２５－５】

CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATT
GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACA
CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGG
TTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAC (配列番号 737)
hSynプロモーター
C 末端 Npu
C 末端 wtCas9

pLenti-U6-DNMT1_ニックを入れる_sgRNA:

【化２６－１】

TAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTT
TAAGAATAGTTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCAT
TATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCAGA*GAGGGCCTATTTCCCATG*
ATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCA
GTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTC
*TTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC**GCCGCGCGCGCGAAAAAGCCGGTTT***
TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA
CCGAGTCGGTGCTTTTTTAAGCTTGGCGTAACTAGATCTTGAGACAAATGGCAGTATTC
ATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATA
GTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAA
TTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGCGCCGGCTCGAG
GGGGCCCGGGTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAAT
GGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGA
GCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGATCCGG
TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC
CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT
TTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG
CCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCA
GTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCT
TGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG
GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCT
CTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTT
GTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCG
ACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGC
CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT
CGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTT
GCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGG
ACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT
TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCAC
CTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTA
TGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCAC
TTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAG
CCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGACGTACGGCCAC
CATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCAGGGC
CGTACGCACCCTCGCCGCCGCGTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGAT
CCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCACGCGCGTCG

【化２６－２】

GGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCCGTGGCGGTCTGGA
CCACGCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGG
CCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCTGGCGC
CGCACCGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGAGTCTCGCCCGACC
ACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGC
GCGCCGGGGTGCCCGCCTTCCTGGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCCCCTTCTACGA
GCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTG
GTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGAACGCGTTAAGTCGACAATCAACCTCTGGAT
TACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGT
GGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCT
CCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGC
AACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGC
CACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGG
AACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA
CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTG
CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCG
GACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCG
CCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCGTCGACTTTAAGACCAAT
GACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAA
GGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTG
GTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAG
CCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTACGT
ATAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGA
GAGTGAGAGGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCA
TCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCC
CCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTAT
GCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT
TTGGAGGCCTAGGGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCAC
TGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCG
CCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG
CATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
CCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCC
CCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACC
TCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAG
ACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCA
AACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCC
GATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTA
ACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCC
CTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG
ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC
CCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGT
GAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGAT
CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAG
CAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACC

【化２６－３】

ATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGC
TAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG
CAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACA
ATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTG
ATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAA
CTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCA
CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG
GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTA
CCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT
AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG
AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCG
GAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGG
CCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCG
CCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGT
GAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC
GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGC
AACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTT
CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCT
ATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGA
GCTGCAAGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATG
AGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAA
GTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTG
GACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATAC
ATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGG
GAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCC
GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA
ATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGC
TCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGC
GACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGT
GCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTT
AAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
CTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAAT
ACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATA
ATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGA
AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGC
GGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATT
ATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGA
GAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGT
TCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGG

【化２６－４】

CCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG
GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGA
ATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCT
CTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCT
CTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATT
ACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGA
ACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACA（
配列番号 738）
U6 プロモーター
sgRNA

【１２２６】

本明細書に使用されたモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(M-MLV RT)バリアントのアミノ酸配列。

PE1 M-MLV RT:

**TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATST
PVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQD
LREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFE
WRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFDEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLL
AATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEAR
KETVMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTKTGTLFNWGPDQ
QKAYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSK
KLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWL
SNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPD
LTDQPLPDADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELI
ALTQALKMAEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRGLLTSEGKEIKNKDEILALLK
ALFLPKRLSIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP(配列番号739)**

M3 M-MLV RT(D200N、T330P、L603W)(Baranauskas et al.[182]を参照):

【化２７】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLR
EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET
VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQKAY
QEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMT
HYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPD
ADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM
AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRL
SIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号
740）

PE2 M-MLV RT(D200N、T306K、W313F、T330P、L603W):

【化２８－１】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLR

【化２８－２】

EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET
VMGQPTPKTPRQLREFLG**K**AGFCRL**F**IPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQKAY
QEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMT
HYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPD
ADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM
AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRL
SIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号
741）

M３-不活性型ＲＴ M-MLV RT:

【化２９】

TLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLIIPLKATSTP
VSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLPVK**L**PGTNDY**S**PVQDLR
EVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGLPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWR
DPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLF**N**EALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAAT
SELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKET
VMGQPTPKTPRQLREFLGTAGFCRLWIPGFAEMAAPLYPLTK**P**GTLFNWGPDQQKAY
QEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDPV
AAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVKQPPDRWLSNARMT
HYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEGLQHNCLDILAEAHGTRPDLTDQPLPD
ADHTWYTDGSSLLQEGQRKAGAAVTTETEVIWAKALPAGTSAQRAELIALTQALKM
AEGKKLNVYTDSRYAFATAHIHGEIYRRRG**W**LTSEGKEIKNKDEILALLKALFLPKRL
SIIHCPGHQKGHSAEARGNRMADQAARKAAITETPDTSTLLIENSSP（配列番号
742）

【１２２７】

例２のための参考文献

以下の参考文献の各々は例１２に引用され、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【表９２－１】

1. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* **44**, D862–D868 (2016).

2. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).

3. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **339**, 819– 823 (2013).

4. Mali, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).

5. Yang, H. *et al.* One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* **154**, 1370–1379 (2013).

6. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019 (2014).

【表９２－２】

7. Orlando, S. J. *et al.* Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Res.* **38**, e152–e152 (2010).

8. Tsai, S. Q. *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPRCas nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 187–197 (2015).

9. Suzuki, K. *et al. In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144–149 (2016).

10. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* **36**, 765–771 (2018).

11. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Med.* **24**, 927–930 (2018).

12. Ihry, R. J. *et al.* p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **24**, 939–946 (2018).

13. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 6064–6068 (1994).

14. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell* **47**, 497–510 (2012).

15. Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* **21**, 121–131 (2015).

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

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

18. Maruyama, T. *et al.* Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* **33**, 538–542 (2015).

19. Rees, H. A., Yeh, W.-H. & Liu, D. R. Development of hRad51–Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. *Nat. Commun.* **10**, 1–12 (2019).

20. Shen, M. W. *et al.* Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature* **563**, 646–651 (2018).

21. Rees, H. A. & Liu, D. R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 770 (2018).

22. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).

23. Gaudelli, N. M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471 (2017).

24. Gao, X. *et al.* Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature* **553**, 217–221 (2018).

【表９２－３】

25. Ingram, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* **178**, 792–794 (1956).

26. Myerowitz, R. & Costigan, F. C. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **263**, 18587–18589 (1988).

27. Zielenski, J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* **67**, 117–133 (2000).

28. Mead, S. *et al.* A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2056–2065 (2009).

29. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843–1845 (2008).

30. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).

31. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529 (2017).

32. Hille, F. *et al.* The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* **172**, 1239–1259 (2018).

33. 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).

34. Liu, Y., Kao, H.-I. & Bambara, R. A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 589–615 (2004).

35. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L. & Corn, J. E. Enhancing homology directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* **34**, 339–344 (2016).

36. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **152**, 1173–1183 (2013).

37. Shechner, D. M., Hacisuleyman, E., Younger, S. T. & Rinn, J. L. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. *Nat. Methods* **12**, 664–670 (2015).

38. Tang, W., Hu, J. H. & Liu, D. R. Aptazyme-embedded guide RNAs enable ligand-responsive genome editing and transcriptional activation. *Nat. Commun.* **8**, 15939 (2017).

39. Jinek, M. *et al.* Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science* **343**, 1247997 (2014).

40. Nishimasu, H. *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).

41. Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S. & Doudna, J. A. A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science* **348**, 1477–1481 (2015).

42. 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).

43. 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).

【表９２－４】

44. 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).

45. 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).

46. Thuronyi, B. W. *et al.* Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nat. Biotechnol.* (2019). doi:10.1038/s41587-019-0193-0

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

48. Koblan, L. W. *et al.* Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat. Biotechnol.* (2018). doi:10.1038/nbt.4172

49. Kleinstiver, B. P. *et al.* High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off target effects. *Nature* **529**, 490–495 (2016).

50. Zuo, E. *et al.* Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* **364**, 289–292 (2019).

51. Jin, S. *et al.* Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* **364**, 292–295 (2019).

52. Kim, D., Kim, D., Lee, G., Cho, S.-I. & Kim, J.-S. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA guided adenine base editors. *Nat. Biotechnol.* **37**, 430–435 (2019).

53. Grunewald, J. *et al.* Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature* **569**, 433–437 (2019).

54. Zhou, C. *et al.* Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature* **571**, 275–278 (2019).

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

56. Ostertag, E. M. & Kazazian Jr, H. H. Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501–538 (2001).

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

58. Berkhout, B., Jebbink, M. & Zsiros, J. Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus. *J. Virol.* **73**, 2365–2375 (1999).

59. 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. *J. Virol.* **74**, 10349–10358 (2000).

60. Dever, D. P. *et al.* CRISPR/Cas9 Beta-globin Gene Targeting in Human Hematopoietic Stem Cells. *Nature* **539**, 384–389 (2016).

61. Park, S. H. *et al.* Highly efficient editing of the β-globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkz475

【表９２－５】

62. Collinge, J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550 (2001).

63. Asante, E. A. *et al.* A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. *Nature* **522**, 478–481 (2015).

64. Zettler, J., Schutz, V. & Mootz, H. D. The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction. *FEBS Lett.* **583**, 909–914 (2009).

65. Kugler, S., Kilic, E. & Bahr, M. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* **10**, 337–347 (2003).

66. de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D. & Brown, J. D. Co-translational, intraribosomal cleavageof polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J. Biol. Chem.* **278**, 11441–11448 (2003).

【１２２８】

1．変異誘発DNA鎖の、ガイドRNAを鋳型にした逆転写を確立する。

背景および論拠

提案されたゲノム編集ストラテジーにおいて、Cas9によってニックが入れられた非標的DNA鎖(Rループを形成するPAM含有鎖)は、DNA合成のためのプライマーとして作用する。これは生化学的データおよび構造のデータの数種の実例(pieces)に基づき起こり得るものと仮定される。ヌクレアーゼ保護実験[32]、結晶学的研究[33]、および塩基編集窓[4,24]は、Cas9結合複合体の所謂Rループ内の非標的鎖ヌクレオチド-20～-10について、柔軟性および障害のかなりの程度を実証した(ナンバリングは第1PAMヌクレオチドの5'からの距離を示す)。その上、相補的なssDNAが加えられたとき、切断された非標的鎖のPAM遠位部分は、緊密に結合した3元複合体から外され得る[20]。これらの研究によって、非標的鎖が高度に柔軟であって酵素へのアクセスが可能であること、およびニックが入った後にPAM遠位フラグメントの3'末端がCas9解離に先立ち放出されることが支持される。さらにまた、gRNAが、鋳型DNA合成まで伸長され得るものと仮定される。先行研究によって、SpCas9、SaCas9、およびLbCas12a(かつてはCpf1)のためのgRNAが、RNAアプタマー[34]、リガンド誘導性自己切断型リボザイム[35]、および長鎖ノンコーディングRNA[36]でのgRNA伸長を許容することが示された。生かされる2つの主要な特色に対し、この文献によって前例が確立される。このストラテジーの査定において、数種のCRISPR-Cas系を、in vitroでのアッセイと細胞アッセイとの組み合わせを使用し5'および3'伸長されたgRNAデザインと併せて評価する(図2A～2C)。

【１２２９】

TRT編集のための改変gRNAのためのデザインを図3A～3Bに示す。DNA合成は5'→3'に進み、よってRNA鋳型を3'→5'方向にコピーする。5'伸長のためのデザインは、リンカー領域、ニックが入ったDNA鎖がアニールするプライマー結合部位、および逆転写によるDNA合成のための鋳型を含有する。3'伸長されたgRNAは、プライマー結合部位および逆転写鋳型を含有する。in vitroでの実験によって、逆転写が、3'伸長されたgRNA構築物のgRNAコア中へ、～3ヌクレオチド伸長することが示されたところ、いくつかのケースにおいて、gRNAコアの3'RNAヘアピンをDNA標的配列とマッチするよう修飾する(ヘアピンRNA構造の維持を代償する変化がなされる限り、ヘアピン配列の修飾には十分耐性があるように見える)。DNA合成は、ヌクレオチドが成長するDNA鎖の3'OHへ付加されながら5'→3'に進む。

【１２３０】

予備実験結果

Cas9によってニックが入れられたDNAは、gRNA鋳型の逆転写をプライムする。ニックが入れられた非標的DNA鎖へのアクセス可能性を評価するため、in vitroでの生化学的アッセイを、S.pyogenes(SpCas9)からのCas9ヌクレアーゼおよびCy5蛍光標識二重鎖DNA基質(51塩基対)を使用して実施した。第1に、合成鋳型の長さが変動する一連の5'伸長含有gRNAを、in vitroでの転写によって調製した(全体的なデザインは図2Bに示される)。ヌクレアーゼ不活性型Cas9(dCas9)を用いた電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)によって、5'伸長されたgRNAが標的への結合親和性を維持することが確立された(データは示さず)。次に、TPRT活性を、dCas9、5'伸長されたgRNA、およびモロニー-マウス白血病ウイルス(M-MLV)逆転写酵素(Superscript III)を使用して、予めニックが入れられたCy5標識二重鎖DNA基質に対し試験した。37℃での1時間のインキュベーション後、産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)によって評価し、Cy5蛍光を使用して撮像した(図4A)。5'伸長されたgRNAバリアントは各々、有意な産物形成をもたらし、観察されたDNA産物サイズは伸長鋳型の長さと一致した(図4B)。重要なことに、dCas9の不在下で、予めニックが入れられた基質はDNA基質の全長51bpまで伸長されたが、これは相補的なDNA鎖(gRNAではない)が、dCas9が存在しないときにDNA合成のための鋳型として使用されたことを強く示唆する(図4C)。注目すべきは、新しく合成されたDNA鎖が、標的部位の編集に要求される産物(単一ヌクレオチドの変化と相同の鎖)を映し出す(mirrors)ように、系をデザインした。この結果は、Cas9:gRNA結合によってニックが入れられた非標的鎖の3'末が晒されること、および非標的鎖が逆転写へアクセス可能であることを確立する。

【１２３１】

次に、ニックが入れられていないdsDNA基質を、非標的DNA鎖へニックを入れるCas9(H840A)突然変異体を使用して評価した。第1に、5'伸長されたgRNAを用いてCas9(H840A)ニッカーゼ活性を試験するため、in vitroでの切断アッセイを、これまでに記載されたとおりに実施した[37]。ニックを入れることは、標準のgRNAと比較すると損なわれていたが、相当の切断産物が形成されていた(図4D)。重要なことに、TPRT反応を5'伸長されたgRNAおよびCas9(H840A)で遂行したとき、より低い収率(ニックを入れる活性の減少によって説明可能)ではあるがRT産物もまた観察された(図4D)。この結果によって、5'伸長されたgRNA:Cas9(H840A)複合体がDNAへニックを入れ、逆転写の鋳型となり得ることが確立される。

【１２３２】

最終的に、3'gRNA伸長を、Cas9(H840A)のニック入れおよびTPRTについて評価した。5'伸長されたgRNAと比較すると、3'伸長されたgRNAによるDNA切断は、標準のgRNAと比較していずれも検出可能な程度までには損なわれていなかった。有意に、3'伸長されたgRNA鋳型もまた、M-MLV RTがtransで供給されたとき、予めニックが入れられた二重鎖DNA基質と無傷の二重鎖DNA基質との両方で効率的な逆転写を支持した(図4E)。驚くべきことに、3'伸長された鋳型について単一産物のみが観察されたが、これは逆転写がgRNA骨格に沿った特定の場所にて終止することを示す。末端トランスフェラーゼでの産物のホモポリマーテール化(Homopolymer tailing)、これに続くクレノウ伸長およびサンガー配列決定によって、全gRNA合成鋳型がgRNAコアの末端3ヌクレオチドが付加されてコピーされたことが明らかにされた。今後、フラップ末端は、末端gRNA配列を修飾することによって再プログラムされるであろう[38,39]。この結果は、3'伸長されたgRNAが、効率的なヌクレアーゼ標的化ガイドとして働き、逆転写の鋳型となり得ることを実証する。

【１２３３】

Cas9-TPRTは、ニックが入ったDNAおよびgRNAをcisで使用する。二色実験を、RT反応が優先的にgRNAとともにcisで(同じ複合体中に結合されている)生じるかを決定するのに使用した(図8を参照)。2つ別々の実験を、5'伸長されたgRNAおよび3'伸長されたgRNAについて行った。所定の実験について、dCas9、gRNA、およびDNA基質の3元複合体を別々の管中に形成させた。一方の管中、gRNAは長いRT産物をコードし、DNA

基質はCy3(赤色)で標識されている;他方の管中、gRNAは短いRT産物をコードし、DNA基質はCy5(青色)で標識されている。短いインキュベーションの後、複合体を混合し、次いでRT酵素およびdNTPsで処置する。産物を尿素-変性PAGEによって分離し、Cy3およびCy5チャネルの蛍光によって視覚化した。反応産物は、予めDNA基質と複合体化されたgRNA鋳型を使用して優先的に形成されることが見出されたが、これはRT反応がcisで生じ得る可能性があることを示す。この結果は、単一のCas9:gRNA複合体がDNA部位を標的にし、変異誘発DNA鎖の逆転写の鋳型になり得ることを支持する。

【１２３４】

TPRTを他のCas系で試験する

先のセクションにおいて提示されたものと同様の実験を、S.aureusからのCas9およびL.bacteriumからCas12aを包含する他のCas系を使用して、遂行する(図2A～2Cを参照)。TRPTもまた、これらのCasバリアントについて実証され得る場合、潜在的な編集範囲および細胞において全般的に成功する可能性が増大するであろう。

【１２３５】

TPRTをRT-Cas9融合タンパク質で試験する

第1に、商業的に入手可能または精製可能な一連のRT酵素をTPRT活性についてtransで評価する。M-MLVからの既に試験されたRTに加えて、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV)、Geobacillus stearothermophilusグループIIイントロン(GsI-IIC)[41,42]、およびEubacterium rectaleグループIIイントロン(Eu.re.I2)[43,44]からのRTを評価する。有意に、後者2つのRTは、それら天然の生物学的な文脈において、TPRTを実施する。関係のある場合、RNAse不活性化突然変異および他の潜在的に有益なRT酵素修飾も試験する。transで供給されたとき機能的RTが同定されたら、各々を融合タンパク質としてCas9バリアントに対し評価する。N末端融合配向とC末端融合配向との両方を、様々なリンカー長さおよび構造と併せて試験する。速度論的な時間経過実験を、TPRTがRT酵素をcisで使用して生じ得るか決定するのに使用する。効率的なTPRT化学を可能にするRT-Cas9融合構造体が構築され得る場合、これは、細胞という文脈における機能的編集の可能性を大いに増大するであろう。

【１２３６】

細胞中の改変gRNAでのCas9標的化

先の副目的(sub-aims)において開発された改変gRNA候補を、Cas9標的化効率を確認するため、ヒト細胞培養実験(HEK293)において評価する。野生型SpCas9を採用する、確立されたインデル形成アッセイ[45]を使用して、改変gRNAを、ヒトゲノム中5部位またはそれ以上の部位にわたり、標準のgRNAと並べて(side-by-side)比較する。ゲノム編集効率を、実験室に収納されているIllumina MiSeqプラットホームを使用する多重アンプリコン配列決定によって特徴付ける。本セクションおよび先行するセクションからの結果から、これに続くデザイン-組み立て-試験サイクルの反復(iterations)という情報を与える洞察力が生み出されることが予想されるが、ここでgRNAは細胞中、逆転写の鋳型化と効率的なCas9標的化との両方に最適化され得る。

【１２３７】

in vitroでの検証結果を図5～7に示す。In vitroでの実験は、ニックが入れられた非標的DNA鎖がDNA合成をプライムするのに柔軟かつ利用可能であること、およびgRNA伸長が逆転写のための鋳型として働き得ることを実証した(図5を参照)。この一連の実験は、編集鋳型の長さを変動させた(左側へ列挙)、5'伸長されたgRNA(図3A～3Bに示されるとおりにデザインされた)を使用した。蛍光標識(Cy5)DNA標的を基質として使用し、この一連の実験においてこれへ予めニックを入れた。これらの実験に使用されたCas9は触媒不活性型Cas9(dCas9)であり、そのためDNAは切れないが、依然として効率的に結合することはできる。モロニーマウス白血病ウイルス(M-MLV)に由来する商業的RTであるSuperscript IIIをtransで供給した。第1に、dCas9:gRNA複合体を精製された構成要素から構成させた。次いで、蛍光標識DNA基質をdNTPsおよびRT酵素と一緒に加えた。37Cでの1時間のインキュベーション後、反応産物を変性尿素-ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動(PAGE)によって分析した。ゲル画像は、逆転写鋳型の長さと一致する長さまで元のDNA鎖が伸長したことを示す。注目すべきことに、dCas9の不在下で遂行された反応は、使用されたgRNAを問わず、51ヌクレオチド長のDNA産物を産生した。この産物は、DNA合成のための鋳型として相補的なDNA(RNAではない)鎖の使用に対応する(データは示さず)。よって、Cas9結合は、DNA合成をRNA鋳型へ向けるのに要される。この一連のin vitroでの実験は、DNA基質へ予めニックが入れられておらず、かつCas9ニッカーゼ(SpyCas9 H840A 突然変異体)を使用する以外は、図5に示されるものと厳密に類似する(closely parallels)。ゲルに示されるとおり、ニッカーゼは、標準のgRNAを使用したときDNA鎖を効率的に切断する(gRNA_0、レーン3)。複数の切断産物が観察されるが、SpyCas9の先行する生化学的研究と一致する。5'伸長はニックを入れる活性(レーン4～8)を損なうが、あるRT産物は依然として観察される。図7は、3'伸長がDNA合成を支持し、Cas9ニッカーゼ活性を有意には生じさせないことを示す。予めニックが入れられた基質(黒色矢印)は、dCas9またはCas9ニッカーゼのいずれかを使用したとき、ほぼ定量的にRT産物へ変換される(レーン4および5)。RT産物(赤色矢印)への50%超の変換が全基質で観察される(レーン3)。RT産物の長さおよび配列を決定するため、産物バンドをゲルから切除し、抽出して配列決定した。これはRTがgRNAコアの3'末端へアピン中へ3ヌクレオチド伸長したことを明らかにした。これに続く実験(示されず)は、これらの3ヌクレオチドが、ヘアピンRNA構造を維持する相補的な変化がなされる限り、標的DNA配列とマッチするために変化され得ることを実証した。

【１２３８】

潜在的な困難および代替手段

(1)RTは、融合体としては機能しない:分子密集および/または好ましくない形状(geometries)は、Cas9融合RT酵素によるポリメラーゼ伸長を妨げ得る。第1に、リンカー最適化は試験できる。DNAプライマーとgRNAとRT酵素との間の空間的な関係性を再配向し得るCas9の循環置換バリアントを評価する。目的2に詳述したとおりの非共有結合のRT動員ストラテジーは試験できる。(2)伸長されたgRNAバリアントによって減少したCas標的化効率:これは、最も5'伸長されたgRNAの問題点になり得るものである。構造データ[24]に基づき、Cas9突然変異体をデザイン、スクリーニングし、gRNA伸長に対してより耐性があるバリアントを同定できる。加えて、gRNAライブラリは、標的化活性を改善するリンカーについて細胞中でスクリーニングできる。

【１２３９】

有意性

これらの予備実験結果は、Cas9ニッカーゼおよび伸長されたgRNAが、transで供給された逆転写酵素を使用して、結合したDNA標的上、標的にプライムされた逆転写を開始し得ることを確立する。重要なことに、Cas9結合は、産物形成にとって極めて重要であることが見出された。おそらく細胞中のゲノム編集にとって絶対的な要件ではないが、RT酵素機能をcisで組み込む系のさらなる開発は、細胞ベースの適用において成功する可能性を有意に増大させるであろう。この目的の残りの側面を達成すると、ヒトゲノムという文脈における高精度ゲノム編集を遂行するための分子基盤が提供されるであろう。

【１２４０】

2．ヒト細胞中のプライム編集を確立する。

背景および論拠

提案のストラテジーにおいて、改変RT-Cas9:gRNA複合体は、変異誘発3'DNAフラップをゲノムの標的部位にて導入する。単一ミスマッチを含有する変異誘発3'フラップは、エネルギー的に利用しやすい隣接5'フラップ(これは優先的に除去される)との平衡を通して、DNA修復機構によって組み込まれるものと仮定する(図1C～1D)。DNA複製および修復機構は、岡崎フラグメントをプロセシングするとき[46]かつ長いパッチの塩基切除修復(LP-BER)の最中[47]、5'ssDNAフラップに遭遇する。5'フラップは、幅広く発現されるフラップエンドヌクレアーゼFEN1の好ましい基質であって、前記酵素は、ホモ三量体のスライド型(sliding)クランプ複合体PCNAによってDNA修復部位へ動員される[48]

。PCNAはまた、他の修復因子(DNAリガーゼLig1を包含する)も同時に動員するための骨格としても働く[49]。PCNAは、「ツールベルト(toolbelt)」として作用すると、細胞分裂の最中ごとに生成される数百万の岡崎フラグメントをプロセシングするのに不可欠である連続フラップ切断およびライゲーションを加速させる[50,51]。これら天然のDNA中間体との類似点に基づき、変異誘発鎖は、5'フラップとの平衡、これに続く5'フラップ切除とライゲーションとの連携を通して組み込まれるものと仮定される。次いで、ミスマッチ修復(MMR)が、いずれかの鎖上に等しい確率で生じるはずであって、編集または復元へ繋がる(図1C～1D)。代替的に、DNA複製が最初に生じ、新しく合成された娘鎖中の編集の組み込みへ直接繋がり得る。このプロセスから期待される最も高い収率は50%ではあるが、複数の基質編集を試みることによって、編集修復の不可逆性に起因して完成へ向かう反応が推進され得る。

【1241】

予備実験結果

DNAフラップは、酵母およびHEK細胞中のプラスミドモデル基質中に部位特異的変異誘発を包含する。提案の編集ストラテジーを試験するため、TPRT産物と似ている変異誘発3'フラップ含有モデルプラスミド基質で研究を始めた。GFPとmCherryとの間に停止コドンをコードする二重蛍光タンパク質レポーターを創出した。変異誘発フラップは停止コドンへの修正をコードしており(図9A)、mCherry合成を可能にさせる。よって、変異誘発効率はGFP:mCherry比率によって定量化できる。プラスミド基質をin vitroで調製し、酵母(S.cerevisiae)またはヒト細胞(HEK293)中へ導入した。高頻度変異誘発が両系ともに観察され(図9B)、単離された酵母コロニーは、元の状態の(reverted)塩基、突然変異塩基、または両産物の混合物のいずれかを含有していた(図9C)。後者の検出は、これらのケースにおいてプラスミド複製がMMRに先立ち生じたことを示唆し、さらに、フラップ切除およびライゲーションがMMRに先行することを示唆する。この結果は、3'変異誘発鎖を使用するDNA編集の実現性を確立する。

【1242】

●モデルラップ基質での系統的な研究

上に記載の予備実験結果に基づき、効率的な編集の原理を推察するため、より広範囲のフラップ基質をHEK細胞において評価する。ミスマッチ対形成の影響、フラップに沿った変異誘発ヌクレオチドの場所、および末端ヌクレオチドの同一性を決定するため、3'ssDNAフラップを系統的に変動させる(図9D)。単一ヌクレオチドの挿入および欠失もまた試験する。編集高精度を分析するため、アンプリコン配列決定を使用する。これらの結果は、gRNA逆転写鋳型のデザイン情報を与えるのに役立つ。

【1243】

プラスミド基質上のIn vitroでのTPRTは、効率的な編集成果へ繋がる。目的1において開発されたTPRT反応を、プラスミド基質内に変異誘発を導入するのに使用した。反応を環状DNAプラスミド基質上で遂行した(図10を参照)。これは、先のin vitroでの実験におけるRT伸長の機序としてDNA鎖が解離する可能性を除外する。これはまた、細胞中のフラップ基質のDNA修復も可能にさせる。二重蛍光レポータープラスミドを酵母(S.cerevisiae)発現のために構築した。このプラスミドは、停止コドン(TGA)を介在してGFP(緑色蛍光タンパク質)およびmCherry(赤色蛍光タンパク質)をコードする。この構築物の酵母中の発現は、GFPしか産生しない。プラスミドを、in vitroでのTRT[Cas9(H840A)ニッカーゼ、改変gRNA、MLV RT酵素、dNTPS]のための基質として使用した。gRNA伸長は、停止コドンに対する突然変異をコードする。フラップ鎖を停止コドンの修復のために使用すると、GFPとmCherryとの両方を発現するプラスミドを融合タンパク質として産生するものと予想される。酵母二重FPプラスミド形質転換体を図10に示す。親プラスミドまたはin vitroでCas9(H840A)がニックを入れたプラスミドを形質転換すると、緑色GFP発現コロニーのみがもたらされる。5'伸長されたgRNAまたは3'伸長されたgRNAでのTRT反応は、緑色コロニーと黄色コロニーとの混合を産生する。後者はGFPとmCherryとの両方を発現する。より多くの黄色コロニーが3'伸長されたgRNAで

観察される。停止コドンを含有しない陽性対照も示す。

【１２４４】

この結果は、長い二本鎖の基質がTPRTを経り得ること、およびTPRT産物が真核細胞中に編集を誘導することを確立する。

【１２４５】

上記のプライム編集実験と同様の別の実験も遂行したが、停止コドン中に点突然変異を組み入れる代わりに、TRT編集は、フレームシフト突然変異を修復しかつ下流mCherryの合成を可能にさせる単一ヌクレオチドの挿入(左)または欠失(右)を取り入れる(図11を参照)。両実験とも、3'伸長されたgRNAを使用した。TRT形質転換体からの個々のコロニーを選択し、サンガー配列決定によって分析した(図12を参照)。緑色コロニーは元のDNA配列をもつプラスミドを含有し、一方黄色コロニーは、TRT編集gRNAによってデザインされた正確な突然変異を含有していた。他の点突然変異もインデルも観察されなかった。

【１２４６】

RT-Cas9構造体を使用するHEK細胞中のプライム編集を確立する

先の目的から最適化された構築物を、哺乳動物発現およびヒトゲノム中の標的部位での編集のために適合させる。複数のRT酵素および融合構造体を、2次gRNA(ニックが入れられるのを防止するためにトランケートされた)での隣接標的化に加えて、試験する。非共有結合のRT動員もまた、Sun-Tag系[52]およびMS2アプタマー系[53]を使用して評価する。インデル形成アッセイを、標準のgRNAおよびRT-Cas9融合体(上のとおり)での標的化効率を評価するのに使用する。次いで、各ゲノムの部位について、伸長されたgRNAとRT-Cas9との対を、単一ヌクレオチドの編集についてアッセイする。編集成果をMiSeqで評価する。

【１２４７】

HEK細胞における最初の実験を、Cas9-RT融合体を使用して実施した。細胞内に発現される構成要素による編集には、Cas9(H840A)ニッカーゼ、逆転写酵素(融合体として発現されるか、またはtransで供給される)、および3'伸長をもつ改変gRNAを要する(図14を参照)。予備研究は、gRNA伸長内のプライマー結合部位の長さがヒト細胞中の編集の効率を増大させるのに重要であることを示した(図15を参照)。

【１２４８】

HEK細胞中のプライム編集パラメータを最適化する

細胞中でプライム編集を実施できるCas9-RT構造体を同定した後、構成要素およびデザインを、高効率編集を達成するのに最適化する。コードされた点突然変異の場所およびヌクレオチド同一性、ならびに新しく合成されたDNA鎖の全長を、編集範囲および潜在的な欠点を評価するために変動させる。短い挿入および欠失の突然変異もまた評価する。タンパク質発現構築物をコドン最適化する。成功した場合、これは、哺乳動物細胞中の効率的なプライム編集を確立するであろう。

【１２４９】

予備実験結果。

万一、融合RT酵素による分子内逆転写が起こり得なかったという場合には、追加のgRNAを、RT酵素が編集遺伝子座にてより高い局所濃度になるようデザインした。これらの補助ガイドを5'末にてトランケートするが(14～15ntスペーサー)、これによってCas9切断は防止されるが結合は保持されることがこれまでに示されている(図16を参照)。HEK3遺伝子座を、このストラテジーを探索するために選んだ。

【１２５０】

潜在的な困難および代替手段

(1)細胞中のgRNA分解:伸長されたgRNA末端が細胞中でトランケートされた場合、安定化2次構造を組み入れるか、または安定化修飾をもつ合成gRNAを試験できる。(2)ヒト細胞中で編集が観察されない:RT-Cas9融合体の隣接ゲノム部位への2次標的化を包含する、追加のストラテジーを探索する[54]。加えて、E.coliまたはS.cerevisiae中の潜在

的な指向進化ストラテジーも探索できる。

【１２５１】

有意性

プライム編集を実験の細胞株中で確立できた場合、これは、ヒト遺伝子中の多数の点突然変異の迅速な生成および特徴付けを可能にすることによって、生物医学の基礎研究に直接の影響を有するであろう。塩基編集因子に関する方法の一般論、およびその直交する編集窓は、目下アクセス不能な多くの突然変異を取り入れるアプローチを提供する。その上、プライム編集を高い効率および産物純度に最適化できた場合、他のヒト細胞型中の疾患突然変異を修正することへのその潜在的な適用性は意義深い。

【１２５２】

3．培養ヒト細胞中の病原性の突然変異の部位特異的編集を達成する。

背景および論拠。

【１２５３】

多数の病原性の突然変異は、PAMの制限に起因する最新の塩基編集因子によっては修正できない、すなわちトランスバージョンまたはインデル突然変異の修正が必要とされる。プライム編集で、すべてのトランジションおよびトランスバージョンは、挿入および欠失が小さい場合ではあるが、理論上起こり得る。その上、PAMとの関係において、プライム編集窓(-3～+4と予想される)は、塩基編集因子(-18～-12)とは違う(図13)。目下、塩基編集因子によって修正不能であるメンデル型疾病は、以下を包含する:(1)ヘモグロビンベータ中の鎌状赤血球病Glu6Val創始者突然変異(A・T→T・Aトランスバージョンを要する);(2)ATP7B中の最も一般的なウィルソン病バリアントHis1069Gln(G・C→T・Aトランスバージョンを要する);および(3)嚢胞性線維症を引き起こすCFTR中の△Phe508突然変異(3ヌクレオチド挿入を要する)。これらの標的の各々は、SpCas9標的化およびプライム編集にとって適切に位置付けられたPAMを含有する。

【１２５４】

予備実験結果。

●HEK3細胞中のT→A編集は、最新の塩基編集では達成できないが、TRPT編集では達成できる(図17A～17Cを参照)。

図17Aは、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞中の構成要素のトランスフェクション後の標的ヌクレオチドでの%T→A変換を表示するグラフを示す。このデータは、野生型MLV逆転写酵素のCas9(H840A)ニッカーゼ(32アミノ酸リンカー)とのN末端融合体を使用する結果を提示する。編集効率は、プライマー結合部位の長さが7ヌクレオチドから11または12ヌクレオチドまで伸長されたとき劇的に改善した。加えて、編集遺伝子座のちょうど上流に位置付けられる補助(auxiliary)ガイドAは(図16を参照)、具体的にはプライマー結合部位の長さがより短い場合に、編集活性を有意に改善する。編集効率を、MiSeqプラットホームを使用するアンプリコン配列決定によって定量化した。図17Bはまた、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞中の構成要素のトランスフェクション後の標的ヌクレオチドでの%T→A変換も示すが、このデータは、RT酵素のC末端融合体を使用する結果を提示する。ここで、補助ガイドAはそれほどの(as much of)効果を有さず、編集効率全体はより高い。図17Cは、図17Aにおいて使用されたものと同様の野生型MLV逆転写酵素のCas9(H840A)ニッカーゼとのN末端融合体を使用する結果を提示するデータを示す;しかしながら、MLV RTとCas9との間のリンカーは、32アミノ酸の代わりに60アミノ酸長である。

【１２５５】

●RPT編集結果によるHEK3部位でのT→A編集は高純度を表示する。

図18は、ハイスループットアンプリコン配列決定による配列決定分析の入力を示す。入力は、編集済細胞の最も豊富な遺伝子型を表示する。注目すべきことに、主要なインデル産物は得られず、所望の点突然変異(T→A)は、バイスタンダー編集をせずとも明確に取り入れられる。第1配列は参照遺伝子型を示す。上側2つの産物は、内生多型を含有する出発遺伝子型(GまたはA)である。下側2つの産物は、修正して編集された遺伝子型を表す。

【１２５６】
●ＭＬＶ ＲＴ突然変異体は編集を改善する。
Ｂａｒａｎａｕｓｋａｓら(ｄｏｉ:１０.１０９３/ｐｒｏｔｅｉｎ/ｇｚｓ０３４)に記載される突然変異逆転写酵素を、ヒト胚性腎臓(ＨＥＫ)細胞中の標的ヌクレオチド編集について、Ｃａｓ９(Ｈ８４０Ａ)ニッカーゼとのＣ末端融合体として試験した。Ｃａｓ９-ＲＴ編集因子プラスミドを、逆転写の鋳型となる３'プライム編集ガイドＲＮＡをコードするプラスミドとともに共トランスフェクトした。図１９において標的ヌクレオチドでの編集効率(青色バー)を、インデル率(オレンジ色バー)と並べて示す。ＷＴは野生型ＭＬＶ ＲＴ酵素を指す。突然変異酵素(Ｍ１～Ｍ４)は、右に列挙された突然変異を含有する。編集率をゲノムＤＮＡアンプリコンのハイスループット配列決定によって定量化した。
【１２５７】
第２ｇＲＮＡで相補鎖へニックを入れることは編集を改善する。
この実験は、単鎖ニックが、標的ヌクレオチドに近接する相補的なＤＮＡ鎖中に導入されたときの、標的ヌクレオチドの編集効率を評価する(これがミスマッチ修復へ指向して、元のヌクレオチドを優先的に除去しかつ塩基対を所望の編集へ変換するとの仮説から)。Ｃａｓ９(Ｈ８４０Ａ)-ＲＴ編集構築物を、２つのガイドＲＮＡ(その一方が逆転写反応の鋳型になり、他方が、ニックを入れるための相補的なＤＮＡ鎖を標的にする)をコードするプラスミドとともに共トランスフェクトした。標的ヌクレオチドから様々な距離にてニックを入れることを試験した(オレンジ色三角形)(図２０を参照)。標的塩基対での編集効率(青色バー)を、インデル率(オレンジ色バー)と並べて示す。「なし」の例は、相補鎖へニックを入れるガイドＲＮＡを含有しない。編集率をゲノムＤＮＡアンプリコンのハイスループット配列決定によって定量化した。
【１２５８】
図２１は、所望のＴ→Ａトランスバージョン突然変異と、他の主要ゲノム編集副産物が全体的に存在しないこととを示す、処理済ハイスループット配列決定データを示す。
【１２５９】
範囲。
新しい編集技術のための潜在的な範囲を図１３に示し、デアミナーゼ媒介の塩基編集因子技術と比較する。これまでに開発された塩基編集因子は、ＰＡＭの上流、～１５±２ｂｐ領域を標的にする。標的ＣまたはＡヌクレオチドを夫々、ＴまたはＧへ変換することによって、これまでに開発された塩基編集因子は、すべてのトランジション突然変異(Ａ:Ｔ→Ｇ:Ｃ変換)を可能にする。しかしながら、これまでに開発された塩基編集因子は、トランスバージョン突然変異(Ａ→Ｔ、Ａ→Ｃ、Ｇ→Ｔ、Ｇ→Ｃ、Ｔ→Ａ、Ｔ→Ｇ、Ｃ→Ａ、Ｃ→Ｇ)を取り入れることはできない。その上、編集窓に複数の標的ヌクレオチドがある場合、望ましくない追加の編集をもたらすことがある。
【１２６０】
新しいプライム編集技術は理論上、いずれのヌクレオチドおよび塩基対の変換も、潜在的に小さい挿入および欠失の編集も取り入れられる。ＰＡＭに関し、プライム編集窓は、ＤＮＡへニックを入れる部位(ＰＡＭの３塩基上流)にて始まり、ＰＡＭの下流の、これまでのところ決定されていない位置にて終わる。注目すべきことに、この編集窓は、デアミナーゼ塩基編集因子とは違う。ＴＰＲＴ系は、ＤＮＡポリメラーゼ酵素を使用して編集を実施することから、一般性、高精度、および忠実度を包含するそれら利益のすべてを有する。
【１２６１】
患者由来細胞株中の病原性の突然変異を修正する。
関係のある突然変異を内包する細胞株(鎌状赤血球病:ＣＤ３４+造血幹細胞;ウィルソン病:培養線維芽細胞;嚢胞性線維症:培養気管支上皮)を、ＡＴＣＣ、Ｃｏｒｉｅｌｌ Ｂｉｏｂａｎｋ、またはハーバード/ブロード連携共同研究所(ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｎｇ Ｈａｒｖａｒｄ/Ｂｒｏａｄ ａｆｆｉｌｉａｔｅ ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ)から得る。編集効率をハイスループット配列決定によって評価し、修正された遺伝子型の有効性を、表現型アッセイ(ヘモグロビンＨＰＬＣ、ＡＴＰ７Ｂ免疫染色、およびＣＦＴＲ膜電位アッセイ)を使用して試験する。

【１２６２】
オフターゲット編集活性を特徴付けする。
潜在的なオフターゲット編集を、野生型Cas9と対になった標的gRNAを使用し、GUIDE-seq[55]およびCIRCLE-seq[56]などの確立された方法でスクリーニングする。潜在的なオフターゲットが同定された場合、これらの遺伝子座をTPRT編集済細胞から探り、真のオフターゲット編集事象を同定する。
【１２６３】
潜在的な困難および代替手段。
(1)低い編集効率:プライム編集因子(PE)は各標的について最適化を要することがある。このケースにおいて、gRNAライブラリは、特定の用途への最高機能バリアントを同定するのに試験できる。RT-Cas融合体の発現および核局在化は最適化できる。リポソームRNP送達を、オフターゲット編集を制限するのに使用できる。
【１２６４】
次の実験。
gRNAデザインの最適化は、プライマー結合部位の長さおよび編集鋳型の伸長のさらなる探査によって達成できる。範囲および一般性を試験することは、種々のヌクレオチド変換、小さい挿入および欠失、ならびに、PAMに関する種々の編集位置、およびヒトゲノム中の複数部位を包含する。RT構成要素の最適化は、MLV RT中の活性(Rnase Hの不活化、プライマー-鋳型結合親和性の増大、処理能力(processivity)の調整)を増強する突然変異、および新しいRT酵素(グループIIイントロンRT、他のレトロウイルスのRT)中の突然変異を探査することを包含する。
【１２６５】
有意性。
無数の遺伝性障害は、個々の遺伝子中の単一ヌクレオチドの変化からもたらされる。ここに記載のゲノム編集技術を開発すること、およびこれを疾患に関係のある細胞型に適用することは、臨床へ移行するための基礎を確立するであろう。鎌状赤血球病などのいくつかの疾患について、単一の点突然変異は、その集団全体にわたって優性遺伝子型を表す。しかしながら、多くの他の遺伝性障害について、単一遺伝子内の種々の点突然変異の大きな不均一性は、患者集団(この各々は同様の疾患表現型を生じている)全体にわたって観察される。したがって、一般のゲノム編集方法は理論上かかる多数の突然変異を標的にできるところ、この技術はこれら患者および彼らの家族の多くへ莫大な潜在的利益を提供できる。これら適用のための原理の証明が細胞中で確立できた場合、疾患の動物モデルにおいて研究するための基盤を確立するであろう。
【１２６６】
利点
高精度:所望の編集は、核酸配列にコード、指向される。一般性:理論上、トランスバージョン編集、ならびに小さい挿入または欠失を包含する、いずれの塩基対変換もなし得る。Cas9プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に関する塩基編集因子とは違う編集窓がある。この方法は相同組み換え修復(HDR)の編集能の多くを獲得するが、HDRの主な欠点(ほとんどの細胞型において非効率であって、大抵、インデルなどの望ましくない過剰の副産物が付随する)がない。前記方法はまた、二本鎖DNA破壊(DSB)、極少数のインデル、転座、大きな欠失、p53活性化等々もない。
【１２６７】
例３－PEによるペプチドタグ付け
【１２６８】
本明細書に記載のプライム編集システム(すなわち、PEシステム)は、種々のペプチドタグをタンパク質コード遺伝子上に導入するためにもまた用いられ得る。かかるタグはHEXAヒスチジンタグ、FLAGタグ、V5タグ、GCN4タグ、HAタグ、Mycタグ、および他を包含し得る。このアプローチは、タンパク質蛍光標識、免疫沈降、イムノブロッティング、免疫組織化学、タンパク質動員、誘導可能なタンパク質デグロン、およびゲノムワイ

ドスクリーニングなどの適用に有用であり得る。態様が図25および26に図示されている。

【１２６９】

図25は、内生ゲノム遺伝子座の遺伝子をペプチドタグ付けするためのgRNAデザインと、TPRTゲノム編集(すなわち、プライム編集)によるペプチドタグ付けとを示す模式図である。FlAsHおよびReAsHタグ付けシステムは2つのパーツを含む:(1)フルオロフォア-ニヒ素系プローブおよび(2)配列FLNCCPGCCMEP(配列番号1)によって例示されるテトラシステインモチーフを含有する遺伝子によってコードされるペプチドである。細胞内で発現されるときに、テトラシステインモチーフを含有するタンパク質はフルオロフォア-ヒ素プローブによって蛍光標識され得る(ref:J.Am.Chem.Soc.,2002,124(21),pp6063-6076.DOI:10.1021/ja017687nを見よ)。「ソルタギング」システムは、標識されたペプチドプローブを好適なペプチド基質を含有するタンパク質に共有結合的にコンジュゲート化する細菌ソルターゼ酵素を使用する(ref:Nat.Chem.Biol.2007 Nov;3(11):707-8.DOI:10.1038/nchembio.2007.31を見よ)。FLAGタグ(DYKDDDDK(配列番号2))、V5タグ(GKPIPNPLLGLDST(配列番号3))、GCN4タグ(EELLSKNYHLENEVARLKK(配列番号4))、HAタグ(YPYDVPDYA(配列番号5))、およびMycタグ(EQKLISEEDL(配列番号6))はエピトープタグとしてイムノアッセイに普通に使用される。パイクランプはペンタフルオロ-芳香族基質によって標識され得るペプチド配列(FCPF)(配列番号622)をコードする(ref:Nat.Chem.2016 Feb;8(2):120-8.doi:10.1038/nchem.2413)。

【１２７０】

図26は、ゲノムDNA上へのHis6タグおよびFLAGタグの精密な組み入れを示す。18nt Hisタグ挿入または24nt FLAGタグ挿入どちらかをコードする逆転写鋳型を有するHEK3遺伝子座を標的化するガイドRNAをデザインした。トランスフェクションされたHEK細胞の編集効率をアンプリコン配列決定を用いて評価した。FLAGタグの完全な24nt配列はビューフレーム外であるということに注意せよ(配列決定は完全なかつ精密な挿入を確認した)。

【１２７１】

<u>例４－PEを用いるRNAタグ付けおよび操作</u>

哺乳類、真核生物、および細菌細胞においてRNAをタグ付けまたは別様に操作する遺伝子配列上へのモチーフの挿入のための新たな方法が、本明細書に記載の。ヒトゲノムの1%のみがタンパク質をコードするということが見積もられているが、ゲノムの実質的に全ては何らかのレベルで転写される。もたらされる非コードRNA(ncRNA)のどれくらい多くが機能的な役割を演ずるのか、ましてやこれらの推定RNAのほとんどの役割が何であるのかは、未解決の問いかけである。目当ての遺伝子上への有用な特性を有する新規のRNAコード配列の挿入によるこれらのRNA分子の「タグ付け」は、細胞におけるRNA分子の生物学的機能を研究するための有用な方法である。それは、どのようにしてmRNA修飾が細胞機能に影響し得るかを撹乱し、それゆえにより良く理解するための手段として、タンパク質をコードするmRNA上にタグを組み入れるにもまた有用であり得る。例えば、ユビキタスな天然のRNAタグのポリアデニル化は、細胞質へのmRNAの輸送に影響するために細胞によって用いられる。異なる型のポリアデニル化シグナルは、異なる輸送速度および異なるmRNA寿命、それゆえにコードされるタンパク質が発現されるレベルの違いをもたらす。

【１２７２】

タグ付けされたRNAを細胞内で発現するための普通のアプローチは、合成構築物を外因的に導入することであり、(i)短期的な突発的な遺伝子発現を多くの場合には超生理学的レベルで生ずる一過性プラスミドトランスフェクション;または(ii)遷延した発現を可能化するレンチウイルス取り入れもしくはトランスポゾンを用いるゲノム上への(ランダムな部位における)タグ付けされたRNA遺伝子の永久的な取り入れどちらかを用いる。これらのアプローチの両方は、変改された発現レベルの生産によっておよび遺伝子の発現ま

たは活性を制御する天然の機序の不在によって限定される。代替的な戦略は、Cas9または他の標的化されたDNAヌクレアーゼによって誘導される二本鎖DNA切断の相同組み換え修復(HDR)を用いて、目当ての遺伝子をその内生遺伝子座において直接的にタグ付けすることである。このアプローチは広い範囲の内生でタグ付けされた遺伝子の生成を可能化するが、HDRは顕著に非効率的であり、そのため、首尾良くタグ付けされた細胞の所望のクローン集団を同定するための有意なスクリーニングを要求する。その上、HDRは、多数の細胞型、最も注意すべきことに有糸分裂後細胞において典型的には非常に非効率的または全く不活性である。HDRの低い効率は望まれないインデル産物の生成によってさらに複雑化し、これはRNA遺伝子のケースにおいて特に問題であり得る。なぜなら、それらはその活性が正常アレルの機能に干渉するRNAの生産に至り得るからである。最後に、最適な性能を達成するためには、研究者は多くの場合にはRNA分子上の種々のタグ付け位置をスクリーニングすることを必要とする。組み合わせると、これらの欠点は、HDRをRNA上のタグの組み入れのためのより望ましくない方法にしている。

【１２７３】

プライム編集は新たなゲノム編集テクノロジーであり、これはRNAからDNAへの遺伝情報の移入によってゲノム遺伝子座の標的化された編集を可能化する。プライム編集を用いて、RNA遺伝子は、種々の構成要素、例えばRNAアプタマー、リボザイム、または他のRNAモチーフによってタグ付けされ得る。プライム編集は、HDR戦略と比較して、多大な種々の細胞型において高速、安価、有効であるポテンシャルを有する。そのため、記載される発明は、健康および疾患におけるRNA遺伝子の生物学を取り調べるための新規の有用なかつ非自明のツールを表す。プライム編集因子(PE)を用いてRNAをタグ付けまたは別様に操作する遺伝子配列上へのRNAモチーフの挿入のための新たな方法が、本明細書に記載の。PEは、CRISPR/Casシステムによって標的化可能である所望のゲノム遺伝子座において、複数のヌクレオチドを部位特異的に挿入、変異、および/または欠失させることができる。PEはCas9ヌクレアーゼドメインと逆転写酵素ドメインとの間の融合体からなる。それらは、DNA標的化のためのガイドスペーサー部分と所望のゲノム編集をコードする逆転写の鋳型とを含有する操作されたPEgRNA(プライム編集ガイドRNA)によってそれらのゲノム標的へとガイドされる(図28Aを見よ)。PEは、RNAレベルで機能的であるモチーフ(これ以降ではRNAモチーフ)を挿入して非コードRNAまたはmRNAをタグ付けまたは別様に操作するために用いられ得るということが想定される。これらのモチーフは、遺伝子発現を増大させるか、遺伝子発現を減少させるか、スプライシングを変改するか、転写後修飾を変化させるか、RNAの細胞下レベル位置付けに影響するか、RNAの単離またはその細胞内もしくは外の位置付けの決定を可能化するか(例えば、蛍光RNAアプタマー、例えばSpinach、Spinach2、Baby Spinach、またはBroccoliを用いる)、内生または外因的なタンパク質またはRNA結合因子を動員するか、sgRNAを導入するか、あるいは自己切断またはRNAseどちらかによるRNAのプロセシングを誘導するための用をなし得る(図28Bを見よ)。プライム編集のフレキシビリティーを原因として、ゲノム上に組み入れられ得るRNAモチーフの網羅的なリストを提供することは可能ではない。ここでは、RNA遺伝子にタグ付けするために用いられ得るPEによって組み入れされるRNAモチーフの予測される範囲を幅広く例解する一連の例が示される。PE以外のいずれかの他の報告されたゲノム編集法を用いては、これらの変化を効率的にかつ相当クリーンになすことは、ほとんどの型の細胞(HDRを支持しない多くを包含する)において現行では可能ではない。

【１２７４】

遺伝子発現は、核輸送もしくは保持またはmRNA寿命の変化をもたらす3'非翻訳領域(UTR)をコードすることによって影響され得る。例えば、ポリオーマウイルスサルウイルス40(SV40)からのポリAテールは、効率的な転写終結を可能化する追加のヘルパー配列を有し、他の3'UTRに対して相対的に遺伝子発現を増大させ得る[57,58]。SV40ポリAテールの例の配列:

【表９３】

SV40 ポリ A テール	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC AAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC CAAACTCATCAATGTATCTTA（配列番号331）

【１２７５】

ポリアデニル化シグナル以外の翻訳後修飾シグナルもまたPEによってコードされ得る。これらの包含されるシグナルは、N6-メチルアデノシン、N1-メチルアデノシン、5-メチルシトシン、およびシュードウリジン修飾を組み込む[59]。PEを用いて、RNA転写物上のこれらの修飾を書き込むかまたは除去する酵素によって結合される配列を包含することによって、それらの書き込みまたは消し去りを誘導することが可能であろう。これは、これらのマーカーの効果を研究するための、細胞分化を誘導するための、ストレス応答に影響するための、またはこれらのマーカーの機能がまだ未調査であるということからは、他の様式で標的細胞に影響するためのツールとして用いられ得る。

【１２７６】

PEは細胞下レベル局在に影響する変異をコードし得る。例えば、mRNA上のtRNA-Lysの組み込みは、理論的にはミトコンドリアへの輸送をもたらし得るが[60]、種々の3'UTRは核保持または輸送をもたらし得る[61]。

【１２７７】

例:

【１２７８】

SV40ポリAシグナルが輸送をもたらす。

【表９４】

SV40 ポリ A テール	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC AAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC CAAACTCATCAATGTATCTTA（配列番号331）

【１２７９】

U1 snRNA 3ボックスは保持をもたらす。

【表９５】

U1 SNRNA 3’ボックス	TTCATTCAGCAAGTTCAGAGAAATCTGAACTTGCTGGATTTTTGGAGCA GGGAGATGGAATAGGAGCTTGCTCCGTCCACTCCACGCATCGACCTGGT ATTGCAGTACCTCCAGGAACGGTGCACCCACTTTCTGGAGTTTCAAAAG TAGACTGTACGCTAAGGGTCATATCTTTTTTTGTTT GGTTTGTGTCTTGGTTGGCGTCTTAA（配列番号625）

【１２８０】

内生RNAの細胞下レベル局在を決定することは難しくあり得、FISHのケースのように外因的な蛍光タグ付けされたヌクレオチドプローブの追加、または時間を消費するかつ可能性として不正確な細胞分画、次にRNA検出を要求する。内生RNA上にプローブをコードすることは、これらのイシューの多くを取り除くであろう。1つの例は、蛍光RNAアプタマー、例えばSpinach[62]またはBroccoliを内生RNA上にコードし、それによって、低分子プロトフルオロフォアの追加によってRNAの存在を視覚化することであろう。

【１２８１】

Broccoliアプタマー:

【表９６】

BROCCOLIアプタマー	GAGACGGTCGGGTCCAGATATTCGTATCTGTCGAGTAGAGTGTGGGCTC（配列番号357）

【１２８２】

ＰＥは、ＲＮＡ結合タンパク質によって認識されるＲＮＡをコードする配列を挿入または除去し得、ＲＮＡ安定性、発現、局在、または修飾に影響する(例えば、列記されているタンパク質を見よ[63])。

【１２８３】

ウイルスまたはがん防御機序として、ＰＥはｓｇＲＮＡをコードする配列をゲノム上に挿入し得る。類似に、それは、標的遺伝子のサイレンシングを導くためのマイクロＲＮＡ(例えば、プレマイクロＲＮＡ)を挿入するために用いられ得る。

【１２８４】

ＰＥは、治療、またはＲＮＡの種々の部分の機能を研究するためのツールとしてどちらかで、それ自体によるかまたは外部の因子によるかどちらかのＲＮＡのプロセシングをもたらす配列を挿入し得る。例えば、ＨＤＶリボザイム[64]は、ＲＮＡ配列上に包含されるときには、リボザイムの直ちに5'のＲＮＡのプロセシングをもたらし、ハンマーヘッドリボザイムはリボザイム上の第3のステムに先行して切断する[65]。他の自己切断リボザイムは、ピストル[66]、ハチェット[66]、ヘアピン[67]、Ｎｅｕｒｏｐｏｒａ Ｖａｒｋｕｄサテライト[68]、ｇｌｍＳ[69]、ツイスター[70]、およびツイスターシスター[66]を包含する。これらの配列はリボザイムの野生型のまたは操作されたまたは進化したバージョンを包含し得る。リボザイムによってカットされる部位がどこに位置付けられるかに依存して、これらのリボザイムの多数はそれらが関連するＲＮＡの領域に依存して異なる配列を有し得る。外部の因子、例えば配列特異的ＲＮＡｓｅ[71]、特定の構造を認識するＲＮＡｓｅ[72]、例えばＤｉｃｅｒ[73]およびＤｒｏｓｈａ[74]によるＲＮＡのプロセシングを導くであろう配列もまた達成され得る。

【１２８５】

【表９７】

HDVリボザイム	GGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATGCTTCGGCATGGCGAATGGGAC（配列番号365）

【１２８６】

例４のための参考文献

【１２８７】

以下の参考文献はこれら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。

【表９８－１】

1. Schek N, Cooke C, Alwine JC. *Molecular and Cellular Biology*. 1992.
2. Gil A, Proudfoot NJ. *Cell.* 1987.
3. Zhao, B.S., Roundtree, I.A., He, C. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017.
4. Rubio, M.A.T., Hopper, A.K. Wiley Interdiscip Rev RNA 2011.
5. Shechner, D.M., Hacisuleyman E., Younger, S.T., Rinn, J.L. Nat Methods. 2015.
6. Paige, J.S., Wu, K.Y., Jaffrey, S.R. *Science* 2011.
7. Ray D., … Hughes TR. Nature 2013.
8. Chadalavada, D. M., Cerrone-Szakal, A. L., Bevilacqua, P.C. RNA 2007.
9. Forster AC, Symons RH. Cell. 1987.
10. Weinberg Z, Kim PB, Chen TH, Li S, Harris KA, Lünse CE, Breaker RR. Nat. Chem. Biol. 2015.
11. Feldstein PA, Buzayan JM, Bruening G. Gene 1989.
12. Saville BJ, Collins RA. Cell. 1990.
13. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Nature 2004.

【表９８－２】

14. Roth A, Weinberg Z, Chen AG, Kim PG, Ames TD, Breaker RR. Nat Chem Biol. 2013.
15. Choudhury R, Tsai YS, Dominguez D, Wang Y, Wang Z. Nat Commun. 2012.
16. MacRae IJ, Doudna JA. Curr Opin Struct Biol. 2007.
17. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ Nature 2001.
18. Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. Gene 2000.

【１２８８】

例５－ＰＥによる免疫エピトープ挿入

ＣＲＩＳＰＲ/Ｃａｓシステムを用いる精密なゲノム標的化テクノロジーが、最近では、標的ゲノム遺伝子座上への操作されたＤＮＡ配列の挿入を包含する広い範囲の適用において調査されている。先には、相同組み換え修復(ＨＤＲ)がこの適用について用いられ、ｓｓＤＮＡドナー鋳型と二本鎖ＤＮＡ切断(ＤＳＢ)の手段による修復開始とを要求した。この戦略は、細胞になされるべき可能な変化の最も幅広い範囲をオファーし、大きいＤＮＡ配列を哺乳類細胞に挿入するために利用可能な唯一の方法である。しかしながら、ＨＤＲは、そのＤＳＢを開始することから派生する望まれない細胞副作用、例えば高いレベルのインデル形成、ＤＮＡ転座、大きい欠失、およびＰ５３活性化によって邪魔される。これらの欠点に加えて、ＨＤＲは多くの細胞型における低い効率によって限定される(Ｔ細胞はこの観察の注意すべき例外である)。これらの欠点を克服するための最近の作業は、ヒトＲａｄ５１変異体をＣａｓ９ Ｄ１０Ａニッカーゼに融合することを包含し(ＲＤＮ)、ＤＳＢフリーＨＤＲシステムをもたらす。これは、改善されたＨＤＲ産物:インデル比およびより低いオフターゲット編集を特色とするが、細胞型依存性および控えめなのみのＨＤＲ編集効率によってなお邪魔される。

【１２８９】

ＰＥｇＲＮＡとカップリングされた逆転写酵素へのＣａｓ９の最近開発された融合体(「プライム編集因子」)は、存在するゲノム編集法と比べていくつもの利点をオファーする新規

のゲノム編集テクノロジーを表し、部位特異的な様式で、いずれかの1ヌクレオチド置換を組み入れおよびヌクレオチドのいずれかの短いストレッチ(最高で少なくとも何ダースもの塩基)を挿入または欠失する能力を包含する。注意すべきことに、PE編集は一般的に低い意図されないインデル率で達成される。そのため、PEは、先には不可能または非実用的であった標的化された挿入に基づく編集適用を可能化する。

【１２９０】

具体的な本発明は、公知の免疫原性エピトープを内生または外生のゲノムDNA上に挿入するための手段としてプライム編集を用いるための方法を記載し、治療学的またはバイオテクノロジー的適用のための対応するタンパク質の改変をもたらす(図31および32を見よ)。プライム編集の本発明に先行しては、かかる挿入は、非効率的にかつDSBからの高いインデル形成率によってのみ達成され得た。プライム編集は挿入編集からの高いインデル形成の問題を解決しながら、一般的にHDRよりも高い効率をオファーする。このより低いインデル形成率は、特に免疫原性エピトープを挿入するという記載されている適用において、標的化されたDNA挿入のための方法としてのHDRと比べたプライム編集の主要な利点を提示する。エピトープの長さは少数塩基～数百塩基の範囲である。プライム編集因子はかかる標的化された挿入を哺乳類細胞において達成するための効率的なかつ最もクリーンなテクノロジーである。

【１２９１】

本発明の鍵の概念は、それらのタンパク質産物および/または発現細胞型の下方制御および/または破壊のために、先に記載された免疫原性エピトープを含有するヌクレオチド配列を内生または外生のゲノムDNA上に挿入するためのプライム編集因子の使用である。標的遺伝子のコードされるタンパク質と挿入される免疫原性のエピトープの対応するタンパク質翻訳との融合タンパク質を生ずる様式で、免疫原性のエピトープ挿入のためのヌクレオチド配列は、遺伝子へと標的化されるであろう。患者の免疫系は、例えば破傷風またジフテリアまたは麻疹に対するルーチンの予防接種からの先行する標準免疫化の結果として、これらのエピトープを認識するように先に訓練されているであろう。融合されるエピトープの免疫原性の性質の結果として、患者の免疫系は、プライム編集されたタンパク質(ただの挿入されるエピトープではない)と可能性としてはそれが発現された細胞とを認識および不能化することが予想されるであろう。

【１２９２】

標的遺伝子への融合体は、挿入されたエピトープタンパク質翻訳が免疫系認識のために暴露されるということを保証するために必要とされるとおり操作されるであろう。これは、標的遺伝子への免疫原性エピトープのC末端融合体、標的遺伝子への免疫原性エピトープのN末端融合体、または遺伝子上へのヌクレオチドの挿入を生むタンパク質翻訳をもたらす標的化されたヌクレオチド挿入を包含し得、その結果、免疫原性エピトープがタンパク質構造の表面の暴露された領域にコードされる。

【１２９３】

標的遺伝子の免疫系認識、細胞輸送、タンパク質機能、またはタンパク質フォールディングを容易化するために、標的遺伝子配列と挿入される免疫原性エピトープヌクレオチド配列との間に挿入されるヌクレオチドとしてコードされるタンパク質リンカーが、本発明の一部として操作されることを必要とし得る。これらの挿入されるヌクレオチドによってコードされるタンパク質リンカーは、可変の長さおよび配列のXTENリンカーまたは可変の長さおよび配列のグリシン-セリンリンカーを包含し得る(が、これらに限定されない)。これらの操作されたリンカーは、タンパク質融合を首尾良く容易化するために先に用いられている。

【１２９４】

本発明の際立った特色は、さもなければ非免疫原性のタンパク質に対する免疫応答を誘導するための手段として、特定のアミノ酸配列に対する先に獲得された免疫応答を用いる能力を包含する。別の際立った特色は、副産物編集としての欲されないインデルの高いレベルを誘導せずかつその挿入が効率的である標的様式で、これらの免疫原性のエピトープ

のヌクレオチド配列を挿入する能力である。本願において論じられる本発明は、細胞型特異的な送達方法(例えばAAV血清型)を組み合わせて、それに対する免疫応答を誘発することが目当てである細胞型にエピトープを挿入する能力をもまた有する。

【１２９５】

免疫原性のエピトープを病原性の遺伝子上に挿入する手段としてのプライム編集は、広い種々の疾患(免疫腫瘍学戦略のがんに限定されない)と戦うように患者の免疫系をプログラムするために用いられ得る。このテクノロジーの直ちに該当する使用は、がんの治療学としてであろう。なぜなら、それは、HER2のような該当するがん遺伝子またはEGFRのような増殖因子に対する免疫応答を引き起こすことによって、腫瘍の免疫エスケープ機序を阻み得るからである。かかるアプローチはT細胞操作に類似に見え得るが、このアプローチの1つの新規の進歩は、操作されたT細胞を生成し患者に導入することを必要とすることなしに、それが多くの細胞型におよびがん以外の疾患に利用され得るということである。

【１２９６】

PEを用いて、ほとんどの者がすでに予防接種されている免疫原性エピトープ(破傷風、百日咳、ジフテリア、麻疹、ムンプス、風疹など)を疾患を駆動する外生のまたは内生遺伝子上に挿入し、そのため、患者の免疫系はそのタンパク質を不能化することを学習する。

【１２９７】

前述の戦略からの可能性ある治療学的な利益を有しそうな疾患は、毒性のタンパク質の凝集によって引き起こされるもの、例えば致死性家族性不眠症を包含する。利し得る他の疾患は、さもなければ非毒性の内生タンパク質の病原性の過剰発現によって引き起こされるもの、および外生の病原体によって引き起こされるものを包含する。

【１２９８】

一次的な治療学的適応は、上で言及されているもの、例えばがん、プリオン、および他の神経変性疾患の治療学、感染性疾患、ならびに予防的な医療を包含する。二次的な治療学的適応は、遅発性の遺伝子疾患を有する患者の予防的ケアを包含し得る。特に侵襲性のがんのようないくつかの疾患では、または薬物治療が疾患が完全に治癒するまで疾患症状を緩和することを助けるケースでは、現行の標準治療の医療がプライム編集と併せて用いられ得るということが予想される。下は、プライム編集因子によって挿入され得る、達成するために用いられ得る免疫エピトープの例である:

【表９９－１】

ワクチン	疾患	エピトープアミノ酸配列	核酸配列の例(8)
1	破傷風トキソイド	QYIKANSKFIGITEL(配列番号396)	CATGATATAAAAGCAAATTCTAAATTTATAG GTATAACTGAACTA(配列番号397)
2	ジフテリア毒素変異体CRM197	GADDVVDSSKSFVME NFSSYHGTKPGYVDSI QKGIQKPKSGTQGNY DDDWKEFYSTDNKYD AAGYSVDNENPLSGK AGGVVKVTYPGLTKV LALKVDNAETIKKELG LSLTEPLMEQVGTEEF IKRFGDGASRVVLSLP FAEGSSSVEYINNWEQ AKALSVELEINFETRG KRGQDAMYEYMAQA CAGNRVRRSVGSSLSC INLDWDVIRDKTKTKI ESLKEHGPIKNKMSES PNKTVSEEKAKQYLE EFHQTALEHPELSELK TVTGTNPVFAGANYA AWAVNVAQVIDSETA DNLEKTTAALSILPGIG SVMGIADGAVHHNTE EIVAQSIALSSLMVAQ AIPLVGELVDIGFAAY NFVESIINLFQVVHNS YNRPAYSPGHKTQPF LHDGYAVSWNTVEDS IIRTGFQGESGHDIKIT AENTPLPIAGVLLPTIP GKLDVNKSKTHISVNG RKIRMRCRAIDGDVTF CRPKSPVYVGNGVHA NLHVAFHRSSSEKIHS NEISSDSIGVLGYQKT VDHTKVNSKLSLFFEI KS(配列番号630)	GGCGCCGACGACGTGGTGGACAGCAGCAA GAGCTTCGTGATGGAGAACTTCAGCAGCTA CCACGGCACCAAGCCCGGCTACGTGGACA GCATCCAGAAGGGCATCCAGAAGCCCAAGA GCGGCACCCAGGGCAACTACGACGACGACT GGAAGGAGTTCTACAGCACCGACAACAAGT ACGACGCCGCCGGCTACAGCGTGGACAAC GAGAACCCCCTGAGCGGCAAGGCCGGCGG CGTGGTGAAGGTGACCTACCCCGGCCTGAC CAAGGTGCTGGCCCTGAAGGTGGACAACGC CGAGACCATCAAGAAGGAGCTGGGCCTGAG CCTGACCGAGCCCCTGATGGAGCAGGTGGG CACCGAGGAGTTCATCAAGAGGTTCGGCGA CGGCGCCAGCAGGGTGGTGCTGAGCCTGC CCTTCGCCGAGGGCAGCAGCAGCGTGGAGT ACATCAACAACTGGGAGCAGGCCAAGGCCC TGAGCGTGGAGCTGGAGATCAACTTCGAGA CCAGGGGCAAGAGGGGCCAGGACGCCATG TACGAGTACATGGCCCAGGCCTGCGCCGGC AACAGGGTGAGGAGGAGCGTGGGCAGCAG CCTGAGCTGCATCAACCTGGACTGGGACGT GATCAGGGACAAGACCAAGACCAAGATCGA GAGCCTGAAGGAGCACGGCCCCATCAAGAA CAAGATGAGCGAGAGCCCCAACAAGACCGT GAGCGAGGAGAAGGCCAAGCAGTACCTGGA GGAGTTCCACCAGACCGCCCTGGAGCACCC CGAGCTGAGCGAGCTGAAGACCGTGACCGG CACCAACCCCGTGTTCGCCGGCGCCAACTA CGCCGCCTGGGCCGTGAACGTGGCCCAGG TGATCGACAGCGAGACCGCCGACAACCTGG AGAAGACCACCGCCGCCCTGAGCATCCTGC CCGGCATCGGCAGCGTGATGGGCATCGCC GACGGCGCCGTGCACCACAACACCGAGGA GATCGTGGCCCAGAGCATCGCCCTGAGCAG CCTGATGGTGGCCCAGGCCATCCCCCTGGT GGGCGAGCTGGTGGACATCGGCTTCGCCGC CTACAACTTCGTGGAGAGCATCATCAACCT GTTCCAGGTGGTGCACAACAGCTACAACAG GCCCGCCTACAGCCCCGGCCACAAGACCC AGCCCTTCCTGCACGACGGCTACGCCGTGA GCTGGAACACCGTGGAGGACAGCATCATCA GGACCGGCTTCCAGGGCGAGAGCGGCCAC

【表９９－２】

			GACATCAAGATCACCGCCGAGAACACCCCC CTGCCCATCGCCGGCGTGCTGCTGCCCACC ATCCCCGGCAAGCTGGACGTGAACAAGAGC AAGACCCACATCAGCGTGAACGGCAGGAAG ATCAGGATGAGGTGCAGGGCCATCGACGGC GACGTGACCTTCTGCAGGCCCAAGAGCCCC GTGTACGTGGGCAACGGCGTGCACGCCAAC CTGCACGTGGCCTTCCACAGGAGCAGCAGC GAGAAGATCCACAGCAACGAGATCAGCAGC GACAGCATCGGCGTGCTGGGCTACCAGAAG ACCGTGGACCACACCAAGGTGAACAGCAAG CTGAGCCTGTTCTTCGAGATCAAGAGC(配列番号399)
3	ムンプス	GTYRLIPNARANLTA(配列番号400)	GGCACCTACAGGCTGATCCCCAACGCCAGG GCCAACCTGACCGCC(配列番号401)
4	ムンプス	PSKFFTISDSATFAPGP VSNA(配列番号402) PSKLFIMLDNATFAPG PVVNA(配列番号404)	Ccgagcaaatttttaccattagcgatagcgcgacctttgcgccgg gcccggtgagcaacgcg(配列番号403) Ccgagcaaactgtttattatgctggataacgcgacctttgcgccgg gcccggtggtgaacgcg(配列番号405) ワクチン株JL5と発生株(表2)との間の発生株(表1)の発散のうち赤血球凝集素-ノイラミニダーゼ(HN)多様性から選択された例
5	風疹ウイルス(RV)	TPPPYQVSCGGESDR ASARVIDPAAQS(配列番号406)	ACCCCCCCCCCCTACCAGGTGAGCTGCGG CGGCGAGAGCGACAGGGCCAGCGCCAGGG TGATCGACCCCGCCGCCCAGAGC(配列番号407)

【表９９－３】

6	ヘマグルチニン	PEYAYKIVKNKKMED GFLQGMVDGWYGHH SNEQGSGLMENERTL DKANPNNDLCSWSDH EASSNNTNQEDLLQR ESRRKKRIGTSTLNQR GNCNTKCQTEEARLK REEVSLVKSDQCSNGS LQCRANNSTEQVD(配列番号408)	CCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAC AAGAAGATGGAGGACGGCTTCCTGCAGGGC ATGGTGGACGGCTGGTACGGCCACCACAGC AACGAGCAGGGCAGCGGCCTGATGGAGAAC GAGAGGACCCTGGACAAGGCCAACCCCAAC AACGACCTGTGCAGCTGGAGCGACCACGAG GCCAGCAGCAACAACACCAACCAGGAGGAC CTGCTGCAGAGGGAGAGCAGGAGGAAGAAG AGGATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGG GGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACCGAG GAGGCCAGGCTGAAGAGGGAGGAGGTGAG CCTGGTGAAGAGCGACCAGTGCAGCAACGG CAGCCTGCAGTGCAGGGCCAACAACAGCAC CGAGCAGGTGGAC(配列番号409)
7	ノイラミニダーゼ	TKSTNSRSGGISGPDN EAPVGEAPSPYGDNPR PNDGNNIRIGSKGYNGI ITDTIEESCSCYPDAKV VKSVELDSTIWTSGSS PNQKIITIGWDPNGWT GTPMSPNGAYGTDGP SNGQANQHQAESISA GNSSLCPIRDNWHGSN RSWSWPDGAE(配列番号410)	ACCAAGAGCACCAACAGCAGGAGCGGCGG CATCAGCGGCCCCGACAACGAGGCCCCCG TGGGCGAGGCCCCCAGCCCCTACGGCGAC AACCCCAGGCCCAACGACGGCAACAACATC AGGATCGGCAGCAAGGGCTACAACGGCATC ATCACCGACACCATCGAGGAGAGCTGCAGC TGCTACCCCGACGCCAAGGTGGTGAAGAGC GTGGAGCTGGACAGCACCATCTGGACCAGC GGCAGCAGCCCCAACCAGAAGATCATCACC ATCGGCTGGGACCCCAACGGCTGGACCGG CACCCCCATGAGCCCCAACGGCGCCTACG GCACCGACGGCCCCAGCAACGGCCAGGCC AACCAGCACCAGGCCGAGAGCATCAGCGC CGGCAACAGCAGCCTGTGCCCCATCAGGGA CAACTGGCACGGCAGCAACAGGAGCTGGAG CTGGCCCGACGGCGCCGAG(配列番号411)
8	H5N1ウイルスヘマグルチニンのTAP(輸送抗原提示)	EKIVLLLAMMEKIVLL LAKCQTPMGAIKAVD GVTNKCPYLGSPSF(配列番号412)	GAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGATG GAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCAAGTGC CAGACCCCCATGGGCGCCATCAAGGCCGTG GACGGCGTGACCAACAAGTGCCCCTACCTG GGCAGCCCCAGCTTC(配列番号413)
9	h5n1ウイルスノイラミニダーゼのTAP(輸送抗原提示)	IRPCFWVELNPNQKIIT IRPCFWVELICYPDAG EIT(配列番号414)	ATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAAC CCCAACCAGAAGATCATCACCATCAGGCCC TGCTTCTGGGTGGAGCTGATCTGCTACCCC GACGCCGGCGAGATCACC(配列番号415)
10	クラスI HLAに対するヘマグルチニンエピトープ	MEKIVLLLAEKIVLLL AMCPYLGSPSFKCQT PMGAIKAVDGVTNK(配列番号416)	ATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCGAG AAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGTGCCCC TACCTGGGCAGCCCCAGCTTCAAGTGCCAG ACCCCCATGGGCGCCATCAAGGCCGTGGAC GGCGTGACCAACAAG(配列番号417)

【表９９－４】

11	クラスI HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	NPNQKIITICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVELI(配列番号418)	AACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATC(配列番号419)
12	クラスII HLAに対するヘマグルチニンエピトープ	MVSLVKSDQIGTSTLNQR(配列番号420)	ATGGTGAGCCTGGTGAAGAGCGACCAGATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGG(配列番号421)
13	クラスII HLAに対するノイラミニダーゼエピトープ	YNGIITDTI(配列番号422)	TACAACGGCATCATCACCGACACCATC(配列番号423)
14	ヘマグルチニンエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	MEKIVLLLAEKIVLLLAMMVSLVKSDQCPYLGSPSFIGTSTLNQRKCQTPMGAIKAVDGVTNK(配列番号424)	ATGGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCGAGAAGATCGTGCTGCTGCTGGCCATGATGGTGAGCCTGGTGAAGAGCGACCAGTGCCCCTACCTGGGCAGCCCCAGCTTCATCGGCACCAGCACCCTGAACCAGAGG(配列番号425)
15	ノイラミニダーゼエピトープH5N1結合クラスIおよびクラスII HLA	NPNQKIITIYNGIITDTICYPDAGEITIRPCFWVELRPCFWVELI(配列番号426)	AACCCCAACCAGAAGATCATCACCATCTACAACGGCATCATCACCGACACCATCTGCTACCCCGACGCCGGCGAGATCACCATCAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGAGGCCCTGCTTCTGGGTGGAGCTGATC(配列番号427)

【１２９９】

下は、免疫エピトープタグ付けのために標的遺伝子上に取り入れされ得るエピトープの追加の例である:

【１３００】

例5に引用された参考文献

以下の参考文献はこれら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。

【表１００】

1. X. Wen, K. Wen, D. Cao, G. Li, R. W. Jones, J. Li, S. Szu, Y. Hoshino, L. Yuan, Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4(+) T cell epitope P2 significantly enhanced the immunogenicity of recombinant rotavirus ΔVP8* subunit parenteral vaccines. *Vaccine* 32, 4420-4427 (2014).

2. G. Ada, D. Isaacs, Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 9, 79-85 (2003).

3. E. Malito, B. Bursulaya, C. Chen, P. L. Surdo, M. Picchianti, E. Balducci, M. Biancucci, A. Brock, F. Berti, M. J. Bottomley, M. Nissum, P. Costantino, R. Rappuoli, G. Spraggon, Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 5229 (2012).

4. J. de Wit, M. E. Emmelot, M. C. M. Poelen, J. Lanfermeijer, W. G. H. Han, C. van Els, P. Kaaijk, The Human CD4(+) T Cell Response against Mumps Virus Targets a Broadly Recognized Nucleoprotein Epitope. *J Virol* 93, (2019).

5. M. May, C. A. Rieder, R. J. Rowe, Emergent lineages of mumps virus suggest the need for a polyvalent vaccine. *Int J Infect Dis* 66, 1-4 (2018).

6. M. Ramamurthy, P. Rajendiran, N. Saravanan, S. Sankar, S. Gopalan, B. Nandagopal, Identification of immunogenic B-cell epitope peptides of rubella virus E1 glycoprotein towards development of highly specific immunoassays and/or vaccine. *Conference Abstract*, (2019).

7. U. S. F. Tambunan, F. R. P. Sipahutar, A. A. Parikesit, D. Kerami, Vaccine Design for H5N1 Based on B- and T-cell Epitope Predictions. Bioinform Biol Insights 10, 27-35 (2016).

【１３０１】

例６－インビボの標的タンパク質の化学物質によって誘導される二量体化を可能化するためのＰＥの使用

本明細書に記載のプライム編集因子は、プライム編集による低分子結合タンパク質をコードする遺伝子のゲノム取り入れによって、二量体化によって誘導される生物学的プロセス、例えば受容体シグナルを、便利な低分子薬物のコントロール下に置くためにもまた用いられ得、本明細書に記載の。本明細書に記載のプライム編集因子を用いて、低分子結合タンパク質をコードする遺伝子配列が、生細胞または患者の目当ての標的タンパク質をコードする遺伝子上に挿入され得る。この編集は単独では生理学的効果を有さないはずである。典型的には夫々が標的タンパク質のコピーに融合されている2つの薬物結合タンパク質ドメインに同時に結合し得る二量体低分子である低分子薬物の投与によって、低分子は標的タンパク質の二量体化を誘導する。それから、この標的タンパク質二量体化イベントは、生物学的シグナルイベント、例えば赤血球形成またはインスリンシグナルを誘導する。

【１３０２】

例７-二重プライム編集因子によるＤＮＡ配列挿入、欠失、および置き換え

この例は、具体的には二重プライム編集因子を用いて、新たなDNA配列の正確な挿入、内生ゲノムDNA配列の正確な欠失、または新たなDNA配列による内生ゲノムDNA配列の置き換えのための多重フラッププライム編集の使用を記載する。図90を見よ。本発明は、ゲノム工学における長年の目標:生細胞のゲノム上のDNA配列のプログラム型の挿入、欠失、または置き換えに対処する。このテクノロジーは、研究、治療、または産業適用についていずれかの生細胞のゲノムを改変または編集するために適用され得る。

【１３０３】

先には、ヌクレアーゼによって誘導される二本鎖DNA切断(DSB)の相同組換え修復(HDR)が、生細胞のゲノム上のDNA配列を挿入するか、欠失させるか、または置き換えるために用いられている。多目的ではあるが、HDRの低い効率は、多くの哺乳類細胞型、とりわけ治療上関係のあるヒト細胞型におけるその適用を限定する[1～4]。その上、DSBの生成はエラーを起こしやすい末端結合メカニズムによる選好的修復に至り、これらは挿入および欠失(インデル)修復産物を生じ、これらは所望の編集されたDNA配列へと続いて変換され得ない[5～10]。結果として、典型的には、ヌクレアーゼが哺乳類細胞に用いられるときには、インデルが改変されたゲノムDNA産物の大多数を表す。その上、ヌクレアーゼによって生成されるDSBは、望まれないゲノム変化、例えば大きい欠失および染色体転座[11]、ならびにp53の活性化に至り得る[12,13]。構造バリアント(SV)もまた、相同組み換えに依拠することなしにプログラム型ヌクレアーゼを用いて生成または修正され得るが、ヌクレアーゼに基づく戦略はこれらの適用について類似の欠点を患う。例えば、二重カット戦略は標的のゲノムDNA配列を逆位させるために用いられ得るが、ほとんどの産物アレルは、所望の逆位した配列の代わりに、カット部位間の大きい欠失または個々のカット部位におけるインデルを含有する。

【１３０４】

プライム編集は最近報告されたゲノム編集テクノロジーであり、これはエラーを起こしやすい二本鎖DNA切断を要求することなしにゲノムDNA配列の挿入、欠失、または置き換えを可能化する[14]。プライム編集は、Cas9を標的ゲノム部位に導くことおよび所望の編集を組み入れるための情報をコードすることの両方をする操作されたプライム編集ガイドRNA(pegRNA)とペアリングされた操作されたCas9ニッカーゼ-逆転写酵素融合タンパク質(PE1またはPE2)を用いる。プライム編集はマルチステップ編集プロセスによって進む:1)Cas9ドメインが標的ゲノムDNA部位に結合し、ニックを入れ、これはpegRNAのスペーサー配列によって規定される;2)逆転写酵素ドメインが、ニックを入れられたゲノムDNAをプライマーとして用いて、逆転写のための鋳型としてpegRNA上の操作された伸長を用いて編集されたDNA鎖の合成を開始する-これは、編集されたDNA配列を含有する一本鎖の3'フラップを生成する;3)細胞性のDNA修復が、5'フラップ種の押し除けによって3'フラップ中間体を解消し、これは、編集された3'フラップによる侵入、元のDNA配列を含有する5'フラップの切除、および新たな3'フラップのライゲーションによって生起して、編集されたDNA鎖を組み込み、1つの編集されたおよび1つの編集されない鎖のヘテロ二重鎖を形成する;4)細胞性のDNA修復が、編集された鎖を修復のための鋳型として用いてヘテロ二重鎖の編集されない鎖を置き換え、編集プロセスを完了する。

【１３０５】

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部位に対して相同である配列の部分を含有するということを要求する。この相同性は、編集された3'フラップがDNA二重鎖上への組み込みについて内生DNA鎖(対応する5'フラップ)と競合することを可能化する。編集された3'フラップは内生5'フラップよりも少ない配列相同性を含有するであろうから、競合は5'フラップ鎖を好むことが予想される。それゆえに、編集を含有する3'フラップは、有効に侵入し5'フラップ鎖を押し除けることに失敗し得る。その上、首尾良い3'フラップ侵入および5'フラップの除去は、二本鎖DNAゲノムの1つの鎖上に編集を組み込むのみである。編集の永久的な組み入れは、細胞性のDNA修復が、編集された鎖を鋳型として用いて編集されない相補的なDNA鎖を置き換えることを要求する。細胞は、二次的なsgRNAを用いる編集に隣接する編集されない鎖上

のニックの導入によって(PE3システム)、編集された鎖よりも編集されない鎖の置き換えを好むようにされ得るが(上のステップ4)、このプロセスは依然としてDNA修復の第2ステージに依拠する。長い5'および3'フラップ中間体の平衡化を要求または長い挿入もしくは長い欠失などの長い非相同的な領域を含有する編集については、これらのDNA修復ステップは特に非効率的であり得る。

【１３０６】

この例は二重プライム編集システム(または二重フラッププライム編集システム)を記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と、編集されない相補的なゲノムDNA鎖への編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。二重フラッププライム編集システムでは、2つのpegRNAが用いられて、ゲノム部位の対向する鎖を標的化し、編集されたDNA配列を含有する2つの相補的な3'フラップの合成を導く(図91)。古典的プライム編集とは違って、編集されたDNA鎖(3'フラップ)のペアが内生ゲノムDNA上の5'フラップと直接的に競合するという要件はない。なぜなら、相補的な編集された鎖が代わりにハイブリダイゼーションに利用可能であるからである。二重鎖の両鎖は編集されたDNAとして合成されるので、二重フラッププライム編集システムは、古典的プライム編集によって要求される編集されない相補的なDNA鎖の置き換えの必要を無用にする。代わりに、細胞性のDNA修復機構が、対形成した5'フラップ(元のゲノムDNA)を切除し、対形成した3'フラップ(編集されたDNA)を遺伝子座にライゲーションすることのみを必要とする。よって、ゲノムDNAに対して相同な配列を新たに合成されるDNA鎖上に包含し、新たな鎖の選択的ハイブリダイゼーションを許し、最小限のゲノム相同性を含有する編集を容易化する必要もまたない。DNAの両鎖をカットするプライム編集因子のヌクレアーゼ活性バージョンもまた、元のDNA配列の除去を加速させるために用いられ得る。

【１３０７】

二重プライム編集因子によって生成される互い違いのDNAニックの向きに依存して、システムは、新たな所望の配列によって2つのニック間の配列を置き換え得るか(5'オーバーハングの互い違いの向き)、または付随的な標的部位重複を有する新たなDNA配列を挿入し得るか(3'オーバーハングの互い違いの向き)どちらかである。図90は、ニック間の配列が置き換えられる向き(5'に押し除けられたニック)を示す。注意すべきことに、新たな3'フラップは新たなDNA配列の長さに沿って完全にオーバーラップする必要はなく、代わりに、新たな配列のある部分だけにおいて相補的であり得る。このやり方で、各フラップは新たなDNA配列の全長よりも短くあり得る。

【１３０８】

<u>HEK293部位3遺伝子座における二重フラッププライム編集</u>

ヒト細胞(HEK293T)のHEK293部位3遺伝子座における二重フラッププライム編集を用いて、異種DNA配列の高度に効率的な導入を達成した。例えば、6×Hisタグをコードする新たな22bp配列による遺伝子座の90bp配列の置き換えは、80%よりも多大な効率で生起した(図92のアレル表)。類似に、この同じ90bp配列をGFP-11ペプチド配列(52bp)によって置き換えることについては、＞60%収量が達成された。GFP-11タグ挿入はMYC遺伝子のC末端においてもまた＞20%の効率で行なわれ、Mycの3'UTR配列のある部分の付随的なプログラムされた欠失を有して生起した。

【１３０９】

<u>二重フラッププライム編集pegRNA</u>

二重フラッププライム編集に用いられるpegRNAの一般的なデザインが図93に示されている。二重フラッププライム編集に用いられるpegRNAは、古典的なプライム編集に用いられるものに類似のデザインを有するが、RT鋳型領域が標的遺伝子座に対するいずれかの相同性をコードすることは必要ではない。代わりに、2つのpegRNAは、それらの3'端が互いの逆相補配列である3'フラップをコードする3'フラップの合成をコードするRT鋳型を含有し得る。3'フラップ間のこの相補性は、それらのアニールと、意図される新たなDNA配列による内生DNA配列の置き換えとを促進する。これは、2つのpegRNA上

のRT鋳型の5'領域が互いの逆相補配列であるということを要し、相補性のこの量は変わり得る(図93)。

【１３１０】

組み換え部位を組み入れるための二重フラッププライム編集の使用

二重フラッププライム編集は、ペプチドタグ、RNAタグ、免疫エピトープ、二量体化ドメイン、およびリコンビナーゼ標的部位を組み入れることなどの多くの可能性としての適用を有する。

【１３１１】

1つのかかる適用は、ゲノム上のユーザによって規定された位置付けにおけるリコンビナーゼまたはインテグラーゼ配列の組み入れである。図94は、ヒトゲノムの標的領域へのBxB1リコンビナーゼattB(38bp)およびattP(50bp)部位の組み入れを例解し(HEK293T部位3またはHEK3)、2つのニック部位間の介在する配列の90bpの同時の欠失を有する。3'フラップ間の種々の度合いの相補性は首尾良い編集を許すが、相補性のより長い配列はインデルに対する所望の編集のより好都合な比を生ずる。他の二重フラッププライム編集適用は、ペプチドもしくはタンパク質配列による遺伝子の内生タグ付け、または変異がエキソン配列内に収まる複数のバリアントを置換するポテンシャルを有する新たなDNA配列によるエキソンの置き換えを包含する。

【１３１２】

二重フラッププライム編集は、ヒトゲノム上の標的の位置に1つまたは2つのリコンビナーゼ部位を導入するために用いられ得る。単一のリコンビナーゼ部位が挿入される場合には、これらは、ゲノムのリコンビナーゼ部位とプラスミドなどの外来的に供給されるDNA上の第2のリコンビナーゼ部位との間におけるリコンビナーゼによって媒介される反応のための着陸地点として用いられ得る。これはDNAカーゴの標的化された取り入れを可能化する。2つのリコンビナーゼ部位がDNAの隣接する領域に挿入される場合には、リコンビナーゼ部位の向きに依存して、これらは、介在配列のリコンビナーゼによって媒介される切除もしくは逆位のために、またはカーゴ取り入れのための外来的なDNAとのリコンビナーゼによって媒介されるカセット交換のために用いられ得る。異なる染色体上の適合性のリコンビナーゼ部位の取り入れは、標的化されたかつ指向的な染色体転座を可能化する。二重フラッププライム編集は、ヒトゲノム上のいくつもの遺伝子座にリコンビナーゼ部位を効率的に導入するために用いられ得る(図94)。それゆえに、DNAリコンビナーゼ酵素との二重フラッププライム編集によるリコンビナーゼ部位取り入れのペアリングは、多くの型のSV編集およびDNAカーゴの標的取り入れを達成するための強力なアプローチを表す。

【１３１３】

例8-四重フラッププライム編集を用いるDNA配列挿入、欠失、逆位、転座、および取り入れ

この例は、内生ゲノムDNA配列の標的化された挿入、欠失、重複、および置き換えのための、ならびに標的化されたゲノムDNA配列逆位、標的化された染色体転座、および外来的なDNAの標的化された取り入れのための、多重フラッププライム編集、具体的には四重フラッププライム編集の使用を記載する。このテクノロジーは、ゲノム工学の長年の目標:構造バリアントのプログラム型の組み入れまたは修正(一般的には＞50bpのゲノム配列変化として定められ、多くの場合には大きい欠失、挿入/重複、逆位、および転座によって表される)、およびヒトゲノム上の特定の位置付けにおけるDNAカーゴの標的化された取り入れに対処するポテンシャルを有する。後者は遺伝子増強治療戦略および他のバイオテクノロジー適用を可能化し得る。このテクノロジーは、可能性として、研究、治療、または産業適用についていずれかの生細胞のゲノムを改変または編集するために適用され得る。

【１３１４】

本発明は多重フラッププライム編集システムを記載する。これは、両方のDNA鎖を同時編集することによって、フラップ平衡化と、編集されない相補的なゲノムDNA鎖への

編集の続く組み込みとに関連する課題に対処する。それは、新たに合成された3'フラップが大きい配列再構成を導くことを許すことによって、従来のプライム編集の能力についてもまた拡張する。

【１３１５】

四重フラッププライム編集アプローチを開発した、これは、(二重フラッププライム編集のような)リコンビナーゼ酵素の必要なしにだが、類似の多目的性を有して、所望の配列変改を直接的に実行し得る。四重フラッププライム編集では、4つの異なるpegRNA配列がPE2編集因子と併せて細胞に送達される。pegRNAの1つのペアは、二重フラッププライム編集のように相補的なDNAフラップの合成の鋳型となり、pegRNAの別のペアは、相補的なDNAフラップの直交的なペアの合成の鋳型となる。これらのフラップの位置付け、それらの相対的な向き、および相補性のペアリングは、どのクラスの再構成が生起するであろうかを決定づける。再構成されたDNAの接合部は、pegRNAを鋳型とする3'フラップによってコードされる配列を含有し、これらは再構成の向きを導き、下流のプロセスにとって有用なDNA配列としての用をなし得る。標的化されたゲノム配列逆位を四重フラッププライム編集戦略によって行なった(図95)。HEK293T細胞のAAVS1遺伝子座における2.7kb配列の逆位を、逆位接合部にBxB1のattBおよびattP配列を置く4つのpegRNAを用いて達成した。予想される接合部の検証をアンプリコン配列決定を用いて行なった。これは配列決定読取の≧90％においてattBまたはattP部位配列を含有する正しい接合部を実証した(図96)。

【１３１６】

外来的なDNAプラスミドの標的化された取り入れをもまた四重フラッププライム編集によって達成した。このアプローチでは、2つのpegRNAが内生ゲノムDNA部位を標的化し、2つのpegRNAがカーゴプラスミド上のある領域を標的化する。3'DNAフラップがゲノムDNA上およびプラスミドDNA上両方に合成され、その結果、プラスミドおよびゲノムDNAがハイブリダイズした3'フラップによって橋かけされるであろう(図97A)。5'オーバーハングの切除およびニックのライゲーションは、取り入れられたプラスミド産物をもたらす。取り入れの向きはpegRNA鋳型配列のペアリングによってコントロールされ得る。

【１３１７】

H2B-GFP融合タンパク質の発現をコードするプラスミドを、四重フラッププライム編集を用いてHEK293T細胞のAAVS1遺伝子座に取り入れた。これは、フローサイトメトリーによって評価される通り、細胞の1.6％が長く続く核局在したGFP蛍光を得ることをもたらした。予測される接合部のPCRは、pegRNAを鋳型とするBxB1のattP配列を含有する予想される産物を示した(図97B)。

【１３１８】

染色体転座をもまた四重フラッププライム編集を用いて行なって(図98A)、染色体8上のMYC遺伝子座および染色体19上のTIMM44遺伝子座の間の染色体転座を導いた(図98B)。

【１３１９】

IDS遺伝子座における二重フラッププライム編集を、pegRNAの12個のペアおよびPE2によって行なった。HEK293T細胞をPE2およびpegRNAの異なるペア(例えば、第1のカラムでは、順方向にattP部位を組み入れるための鋳型を有するpegRNAA1_aおよびpegRNAB2_a)によってトランスフェクションした。効率をHTSによって測定した。このデータは、二重フラップ編集が最高で～80％の効率でIDS遺伝子座に目当ての配列を首尾良く挿入し得るということを示した(図99)。

【１３２０】

二重フラップによって媒介される重複をもまた293T細胞のAAVS1遺伝子座において行なった(図100A)。二重フラップpegRNAをPE2に用いて、AAVS1の遺伝子配列の重複を誘導した(図100B)。

【１３２１】

MYC-CCR5の多重フラッププライム編集によって誘導される転座をもまた行なった(図101)。MYC-CCR5転座を四重フラップpegRNAおよびPE2によって誘導した。MYC-CCR5転座イベントを四重pegRNAによって誘導した。pegRNAの4つの異なるセットをHEK293T細胞で試験した。導出されたchr8およびchr3の間の転座接合部産物を接合部プライマーによって増幅した。予想される接合部アレルに対してアラインメントされた読取のパーセントがグラフに示されている。これは、四重フラッププライム編集が、MYCおよびCCR5遺伝子の転座を媒介し得、産物純度が接合部1において100%近くおよび接合部2において～50%であるということを示している。代表的なアレルのプロットは、接合部1における予想されるアレル配列に対してアラインメントされた配列を示す。

【１３２２】

二重フラップおよび四重フラッププライム編集を他のヒト細胞株においてもまた行なった(図102A～102B)。二重フラッププライム編集を4つの異なるヒト細胞株において行なった(図102A)。HEK293TおよびHeLa細胞を、3つの異なるゲノム遺伝子座(IDS、MYC、およびTIMM44)を編集するための二重pegRNAおよびPE2によってトランスフェクションした。U2OSおよびK562細胞を同じ構成要素によってヌクレオフェクションした。二重フラッププライム編集は、全ての4つのヒト細胞で、標的遺伝子座において、特にHEK293TおよびK562細胞において、ロバストな編集効率を示した。二重フラッププライム編集を可能化するための細胞性のメカニズムは多くのヒト細胞型において保存されている。2.7kb配列の多重フラップ(四重pegRNA)によって導かれる逆位をもまたHeLa細胞のAAVS1遺伝子座において行なった(図102B)。

【１３２３】

逆位効率をもまたCCR5遺伝子座においてHTSによって測定した(図103A～103B)。予想される逆位編集アレルのパーセンテージをHTSによって測定した。PE2の4つの四重pegRNAセットをそれぞれHEK293T細胞にトランスフェクションした。HEK293T細胞のCCR5遺伝子座における二重フラップによって媒介される配列重複(～100nt)を行なった(図103A)。編集効率はHTS300サイクルペアエンド配列決定分析によると～1.5%を達成する。四重フラップによって媒介される配列逆位(～95～117nt)をもまたHeLa細胞のCCR5遺伝子座において行なった(図103B)。編集効率はHTS300サイクルペアエンド配列決定分析によると～1.2%を達成する。この結果は、多重フラッププライム編集が正確にCCR5遺伝子座における重複および逆位を首尾良く媒介し得るということを示している。標的配列が重複するときには、編集特異性は高い(インデルのパーセンテージ＜2%)。

【１３２４】

次に、HEK293T細胞を、pegRNAおよびPE2と共に、Exo1、Fen1、赤色蛍光タンパク質(対照)、DNA2、Mlh1 neg、およびP53阻害因子を発現するプラスミドによってトランスフェクションした(図104A～104D)。編集効率をHTSによって測定した。編集効率を候補およびRFP対照の間で比較した。HEK293T細胞を、siRNAプラスミドならびにpegRNAおよびPE2によってもまた各標的遺伝子座についてトランスフェクションした(図104E)。非標的化siRNA(siNT)を対照として用いた。編集効率をHTSによって測定した。編集効率を各標的遺伝子座において各siRNAノックダウンおよびsiNT対照の間で比較した。HEK293T細胞を、二重pegRNA、PE2、ならびにそれぞれExo1、Fen1、赤色蛍光タンパク質(対照)、DNA2、Mlh1 neg、およびP53阻害因子を発現するプラスミドによってトランスフェクションした。編集効率をHTSによって測定した。編集効率を候補およびRFP対照の間で比較した。FEN1の過剰発現は全ての4つの標的遺伝子座(MYC、TIMM44、IDS、CCR5)における二重フラップ編集効率を改善するということが見出された。

【１３２５】

二重フラップによって媒介される配列重複をもまたAAVS1遺伝子座において行なった(図105A)。2つの固有の3'フラップ構造を生成する二重pegRNAを用いることによって、～300bp配列重複を293T細胞のAAVS1遺伝子座に導入した(図105B)。予想される

アレルを特異的なプライマーによって増幅し、HTSに付した。読取のおよそ94％が、重複を有する予想されるアレルに対してアラインメントされた。重複産物は無処置サンプルでは観察されなかった。

【１３２６】

標的化されたIDSゲノム配列逆位をもまた四重フラッププライム編集によって行なった(図106)。ハンター症候群患者のおよそ13％はIDS遺伝子配列の逆位を有することが示されている(Bondeson et al., Human Molecular Genetics, 1995)。四重フラッププライム編集を適用して、HEK293T細胞においておよそ40kbのIDSゲノム配列のこの病原性の逆位を誘導した。四重pegRNAの6つのセットを、pegRNAおよびPE2によってHEK293T細胞をトランスフェクションすることによって試験した。プライマーを用いて、接合部「ab」および接合部「cd」において逆位した配列を特異的に増幅した。およそ95％の予想される逆位したアレル配列がIDS_QF1では両方の接合部において観察された。pegRNAの他のセットもまた両方の接合部における予想されるアレル配列の高いパーセンテージを生み出す。逆位した接合部産物は無処置のサンプルでは観察されない。

【１３２７】

PegRNAの3'モチーフ修飾はIDS遺伝子座における二重フラップ編集効率を改善するということもまた見出された(図107)。二重フラップ編集効率をさらに改善するために、シュードノットevoPreQ1モチーフを導入してpegRNAの3'端を保護した。未修飾のおよびevoPreQ1修飾された二重pegRNAによって生成される編集効率を比較すると、修飾pegRNAでは標的のIDS遺伝子座において編集効率の総体的な増大があった。二重フラップ編集効率の改善は最高で5.3倍に達し得る。

【１３２８】

参考文献(例7および8):

1. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. PNAS 91, 6064-6068 (1994).

【１３２９】

2. Heyer, W.-D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 44, 113-139 (2010).

【１３３０】

3. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. Mol. Cell 47, 497-510 (2012).

【１３３１】

4. Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nature Medicine 21, 121-131 (2015).

【１３３２】

5. Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. Mol Cell Biol 14, 8096-8106 (1994).

【１３３３】

6. Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. Genetics 161, 1169-1175 (2002).

【１３３４】

7. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nat Rev Genet 11, 636-646 (2010).

【１３３５】

8. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Scie

nce 339, 823-826 (2013).
【１３３６】
9. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013).
【１３３７】
10. Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013).
【１３３８】
11. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR?Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nature Biotechnology 36, 765-771 (2018).
【１３３９】
12. Ihry, R. J. et al. p53 inhibits CRISPR?Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. Nature Medicine 24, 939-946 (2018).
【１３４０】
13. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR?Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nature Medicine 24, 927-930 (2018).
【１３４１】
14. Anzalone, A. V. et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 576, 149-157 (2019).
【１３４２】
例9-ツインプライム編集および部位特異的リコンビナーゼによるプログラム型の大きいDNA欠失、置き換え、取り入れ、および逆位

ゲノム上の規定された位置付けにおけるDNA配列の標的化された欠失、置き換え、取り入れ、または逆位は、原理的には、多くのヒト遺伝疾患を研究または処置するために用いられ得る。しかしながら、哺乳類細胞ゲノムの文脈においてこれらのDNA配列トランスフォーメーションを正確にかつ効率的に実行することは難題のままである。本願においては、二本鎖DNA切断を要求することなしに内生ヒトゲノム部位のDNA配列のプログラム型の置き換えまたは切除のための方法のツインプライム編集(ツインPE)が提示される。ツインPEは、プライム編集因子(PE)タンパク質と、ゲノムDNAの対向する鎖上の相補的なDNAフラップの合成の鋳型となる2つのプライム編集ガイドRNA(pegRNA)とを使用し、pegRNAによってコードされる配列によるPEによって誘導されるニック部位間の内生DNA配列の置き換えをもたらす。本願においては、ツインPEが最高で780bpの正確な欠失と最高で108bpの新たな配列によるゲノムDNA配列の正確な置き換えとを行ない得るということが示される。単一のまたは多重のツインPEを部位特異的セリンリコンビナーゼと組み合わせることによって、AAVS1、CCR5、およびALBを包含するセーフハーバー遺伝子座における遺伝子サイズのDNAプラスミドの標的化された取り入れと、さらに、普通のハンター症候群アレルを修正するために用いられ得るIDSにおける39kb逆位ともまた実証されるということが実証される。ツインPEは、二本鎖DNA切断を要求することなしにゲノム編集能力を実質的に拡張し、他のゲノム編集ツールとの組み合わせで、ヒト細胞における複雑な病原性のアレルバリアントの修正または相補を可能化する。
【１３４３】
疾患関連ヒト遺伝子バリアントは、1塩基対置換からメガ塩基スケールの欠失および再構成の範囲である種々の配列変化によって生ずる。ヒト細胞においてこれらの病原性のバリアントを組み入れ、修正、または相補し得るゲノム編集アプローチは、ヒト遺伝疾患の理解を進展させるポテンシャルを有し、新規の治療学の開発に至り得る。最近、ヌクレアーゼ、塩基編集因子、およびプライム編集因子を包含するゲノム編集のためのCRISPR-Casシステムに基づくいくつかのゲノム編集アプローチが開発された。CRISPR-Casヌクレアーゼは、1つのガイドRNAと共に用いられるときには、確率論的なインデルに至る

二本鎖DNA切断(DSB)の生成によって遺伝子を破壊するために用いられ得る。塩基編集因子は、C・G→T・AもしくはA・T→G・Cのトランジション塩基対編集、またはC・G→G・C塩基対の編集を正確に組み入れるために用いられ得る。プライム編集因子は、12個の塩基対置換編集ならびに小から中サイズの挿入および欠失のいずれか1つを正確に組み入れ得る。しかしながら、これらの戦略は、より実質的なゲノム編集、例えば大きい欠失、挿入、置き換え、または逆位を作ることに単独では直接的に適用可能ではない。

【１３４４】

先に、ペアリングされたCas9ヌクレアーゼ戦略が、長さが～50から＞100，000塩基対の範囲であるゲノムDNA配列の標的化された欠失のために開発された。その上、直鎖ドナーDNA配列を提供することによって、新たなDNA配列の標的化された挿入が、単一のカット部位においてまたはペアリングされたカット部位間において、末端結合または相同組み換えDNA修復プロセスによって行なわれ得る。多くのやり方で多目的ではあるが、単一のヌクレアーゼおよびペアリングされたヌクレアーゼのアプローチはいくつかの欠点によって随伴される。第1に、欠失のためのペアリングされたヌクレアーゼの使用は複数のオンターゲット副産物を生成し得る。インデルを有する所望の欠失、所望の欠失なしの個々のDSB部位におけるインデル、DSB部位間のDNA配列の望まれない逆位、およびDSB部位における外来的なDNA配列の意図されない取り入れを包含する。さらにその上、欠失の正確な位置付けは、PAMの利用可能性と、ヌクレアーゼによって生成される対応するカット部位とによって制限される。類似の制限および副産物がDNAドナーノックインで存在する。これは、多くの場合には、相同性非依存的なアプローチが用いられるときに、配列の向きのコントロールなしで生起する。最後に、追加のガイドRNAでより蓋然的になるオンターゲットおよびオフターゲット部位における複数のDSBの同時の生成は、オフターゲットゲノム改変、染色体再構成、またはクロモスリプシスに至り得る。よって、より大きいDNA配列の切除、置き換え、または挿入のためにヌクレアーゼに基づく編集戦略を適用するときには、産物コントロールおよび純度に関して相当の課題が存在する。

【１３４５】

プライム編集は、高い所望の産物対副産物比で、ヒト細胞において最高で～40bpの正確な挿入および最高で～80bpの欠失を作ることができることが示されている。原理的には、プライム編集は、DSBの生成を回避することによってヌクレアーゼに関連する課題の多くを迂回するために用いられ得る。しかしながら、プライム編集は、典型的な遺伝子コード配列のサイズのより大きい挿入および欠失を媒介することは未だ示されず、単純なプライム編集反応の前提のメカニズムは、長いpegRNA逆転写鋳型を要求することによって、これらのより大きいDNA変化を困難にする。部位特異的DNAリコンビナーゼ酵素は、大きいDNA配列の切除、逆位、取り入れ、または交換を包含するいくつかのDNAトランスフォーメーションを行なう能力を有する。しかしながら、部位特異的リコンビナーゼをリプログラミングすることについての課題は、現行では、ゲノム工学および編集の適用のために適用することを難題にしている。

【１３４６】

本願においては、ツインプライム編集(ツインPE)の開発が提示される。これは、ヒト細胞において高い効率で内生ゲノム部位におけるDNA配列の欠失、置換、または挿入を可能化する。これらの変化に加えて、ツインPEは、ヒトゲノム上の標的部位に高い効率で1以上のリコンビナーゼ認識部位を取り入れるために用いられ得るということが示される。これは続いて部位特異的セリンリコンビナーゼ酵素の基質として用いられ得、これは遺伝子カーゴの標的化された取り入れまたはゲノムDNA配列の標的化された逆位を可能化する。

【１３４７】

結果

プライム編集は、触媒的に損なわれたCas9ニッカーゼおよび野生型の(PE1)または操作された(PE2)MMLV逆転写酵素の誘導体を含むプライム編集因子タンパク質と、標的

ゲノム部位を規定することおよび所望の編集をコードすること両方をするプライム編集ガイドRNA(pegRNA)とを用いる。標的部位認識によって、PE・pegRNA複合体はPAM含有DNA鎖にニックを入れ、ニックを入れられた鎖をプライマーとして用いてゲノムDNA上にpegRNAのRT鋳型を直接的に逆転写する。逆転写後に、新たに合成された3'フラップはそれが大きくは相同である隣接するDNAに侵入して、冗長な5'フラップ配列を置き換える。次いで、対向する編集されない鎖は、編集されたDNA鎖を鋳型として用いて修復される。よって、この提案される編集経路は、細胞性のDNA修復が所望の編集を拒絶しDNA配列をその元の形態に復帰させ得る2つの機会を提示する。

【１３４８】

DNA修復における可能性として忌避されるステップをバイパスすることは、プライム編集が増大した効率で生起することおよび別種のクラスのゲノム編集を可能化することを許し得るということが予測された。さらにその上、それぞれが1つのまたは別のDNA鎖を標的化し、かつ別のpegRNAを鋳型とする配列に対して相補的である3'フラップDNA配列の合成の鋳型となるpegRNAのペアを用いるツインプライム編集(ツインPE)戦略が想定された(図108A)。新たに合成されるDNA鎖が内生標的部位と高度に相違する場合には、3'フラップは選好的にハイブリダイズして、新たなDNA配列のアニールした3'オーバーハングおよび元のDNA配列のアニールした5'オーバーハングを所有する中間体を生出するであろうという仮説が立てられた(図108A)。両方の編集された鎖がプライム編集因子複合体によって合成されるので、編集含有フラップ鎖による標的部位の侵入の、または編集が相補的なDNA鎖にコピーされるという要件はない。元のDNA配列(アニールした5'オーバーハング)の切除、ポリメラーゼによるギャップのフィルイン、およびニックのペアのライゲーションは、ペアリングされた3'フラップ配列によるニック部位間の内生配列の置き換えをもたらすであろう(図108A)。鋳型デザインのフレキシビリティーを原因として、編集は原理的には新たなDNA配列を導入し得るか、DNA配列のある部分を置き換え得るか、またはDNA配列のある部分を欠失させ得る。

【１３４９】

ツインPE戦略を評価するために、HEK293TのHEK部位3遺伝子座(先にはHEK3と言われた)を標的化して、38bpのBxB1のattBアタッチメント配列によって90bpの内生配列を置き換えた(図108B)。各プロトスペーサーについて、3つのpegRNAを、38bpのattB配列の30、34、または38ntを含有するRT鋳型を有してデザインした(図108C)。これらのpegRNAのペアの組み合わせは、22～38bpの範囲であるオーバーラップする相補性を有する3'フラップを生成することが予測される(図108C)。面白いことに、両方のpegRNAがプラスミドDNAトランスフェクションによってPE2と併せて細胞に送達されたときには、attB部位挿入の高い効率が観察され、pegRNAのいくつかの組み合わせは、アンプリコン配列決定に基づくと所望の産物への＞80％変換を生み出した(図108C)。50bpのBxB1のattPアタッチメント配列の挿入のための類似の戦略は、最高で58％に達する効率による編集を達成した(図108C)。注意すべきことに、各pegRNAが全長の挿入配列をコードすることは必要ではなかった。なぜなら、部分的にオーバーラップする相補的なフラップは全長attBまたはattP配列の組み込みを可能化したからである。しかしながら、より多大なオーバーラップを有する3'フラップは、HEK部位3におけるBxB1のattBおよびattP配列の挿入について、わずかに高い編集効率および少数のインデルに至った。

【１３５０】

次に、ツインPEを試験して、それが、PE2またはPE3システムを用いて実証されたものよりも大きいDNA配列の挿入を支持し得るかどうかを決定した。第1に、12～321bpの範囲であるFKBP12コード配列断片のPE3によって媒介される挿入を調べた。HEK部位3遺伝子座をPE3によって標的化すると、そこそこの効率がより短い12bpおよび36bp挿入では達成されたが(それぞれ31.8％および17.3％)、非常に少ない所望の産物が108bp挿入では観察され(0.8％)、321bp挿入の全長産物は観察されなかった(図109A)。対照的に、ツインPEは108bp断片について16％の挿入効率を可能化し、PE3よりも20

倍の改善にまでなった。さらにその上、ペアリングされたBxB1リコンビナーゼ部位を含有する113bpおよび103bpの挿入が、類似の効率(それぞれ10.7％および9.7％)でCCR5遺伝子座において達成された(データは示さない)。これらの結果は、PE3と比較してツインPEを用いるより大きい配列挿入のポテンシャルを例解している。

【１３５１】

ツインPE戦略の1つの可能性としての適用は、タンパク質配列を維持する再コード化されたDNA配列によるエキソンコード配列の置き換えであり、標的のツインPEによって誘導されるニック部位間のいずれかの変異を修正するポテンシャルを有する。このアプローチを試験するために、PAH遺伝子を標的化した。これの変異は遺伝代謝障害のフェニルケトン尿症(PKU)を引き起こす。エキソン4およびエキソン7の部分の再コード化を野生型HEK293T細胞のPAHにおいて試験した。ここでは、修正的な編集が検出可能である。異なるフラップオーバーラップ長さを試験することによって、かつpegRNAの3'端へのevoPreQ1モチーフの追加によって、所望の配列再コード化をそこそこの効率で達成した。エキソン4の64bp再コード化では最高で9.4％の平均効率、エキソン7の46bp再コード化では最高で22.7％の平均効率、エキソン7の64bp再コード化では最高で27.4％の平均効率に達した(図109B)。bioPKUデータベース上のアノテーションされた変異に基づくと、これらの領域のツインPE編集はまとめてPKUに関与する別種の変異の修正を許す。調べられた追加のエキソンもまたより低い効率でだが再コード化され得た(図112)。これらの結果は、ツインPEが、原理的には、pegRNAの単一のペアによって複数の変異を修正するために用いられ得るということを実証している。

【１３５２】

DNA配列の挿入および置き換えに加えて、ツインPEは正確な欠失編集をもまた作る能力があるはずである。ペアリングされたヌクレアーゼの欠失戦略は、2つのDSB部位にまたがる欠失を生成し、それゆえにPAMの利用可能性によって制限され、所望の欠失は多くの場合には望まれないインデル副産物によって随伴される。対照的に、ツインPEは、ツインPEによって誘導されるニック部位におけるDSB生成の欠如および追加のDNA配列を書き込む能力を原因として、より多大なフレキシビリティーおよび精度で欠失を作るポテンシャルを有する。ツインPEを正確な欠失について評価するために、ペアリングされたpegRNAを用いる3つの戦略:「シングルアンカー」ツインPE戦略、「ハイブリッドアンカー」ツインPE戦略、および最近報告された「プライムDel」戦略を比較した(図109C)。各戦略は、相補的なフラップ上にコードされる配列が異なり、ニック部位に対する欠失の位置のフレキシビリティーを許す。

【１３５３】

シングルアンカー戦略を用いて、13ntの相補的なフラップを用いて、pegRNAによって誘導されるニック部位の1つに隣接する77bpの配列を14.8％の効率で欠失させ、34ntの相補的なフラップを用いて、56bpの配列を18.8％の効率で正確に切除した(図109D)。ハイブリッドアンカー戦略を用いて、産物が各ニックの3'の13bpの配列を保持するようにして、pegRNAによって誘導されるニック部位間の64bpを11.7％の効率で欠失させた(図109D)。最後に、プライムDel戦略を、pegRNAによって誘導されるニック部位の間の90bpの欠失について試験し、これは40.4％の効率で生起した(図109D)。注意すべきことに、プライムDel戦略は両鎖上のPAM配列を破壊する。これは蓋然的には効率を増大させながら、インデルをもまた減少させる。編集効率は、いくつかのケースではインデルの随伴的な増大を有してだが、pegRNAの3'端のevoPreQ1モチーフの追加によって1.5倍～2.5倍改善され得た(図109D)。一緒になって、これらのデータは、ツインPEが高いフレキシビリティーによって標的化された欠失を行なうための戦略を提供し、これは完璧に位置したヌクレアーゼカット部位の利用可能性に依拠しないということを示している。

【１３５４】

終わりに、治療上関係のある遺伝子座のDMDを標的化して、より大きい欠失のためにツインPEを適用した。デュシェンヌ型筋ジストロフィーを担っている病原性のDMDアレ

ルはエキソンを含有する領域の大きい欠失を普通に含有し、これらはフレームシフトしたmRNA転写物をもたらす。欠失したエキソンの置き換えなしの全長ジストロフィンタンパク質の産生はタンパク質機能の部分的な救済に至り得るので、読み枠を復活させる第2のエキソンの破壊が可能性としての治療戦略として提案されている。3つのツインPE欠失戦略を、先に報告されたCas9ヌクレアーゼ欠失戦略と併せて、DMDのエキソン51を切除することについて調べた。シングルアンカーツインPE欠失アプローチを用いると、14.4%～24%の効率が、DMDのエキソン51を含有する780bp配列の欠失について観察された(図109E)。ペアリングされたCas9ヌクレアーゼの戦略はツインPE戦略(平均で14%～24%)と比較して高い欠失効率(平均で49.8%)を達成したが、ペアリングされたCas9ヌクレアーゼによって媒介される欠失は、ツインPE(1%～12%の総インデル)と比較してかなり高いインデルレベル(インデルありの33%の所望の欠失、所望の欠失なしの11%のインデル)によってもまた随伴された(図109E)。DMDのエキソン51は、プライムDel戦略によって627bp欠失(28.8%の平均効率)もしくはシングルアンカーツインPE戦略によって590bp欠失(26.4%の平均効率)を生成する代替的なスペーサーペアを用いて、または38bpのBxB1のattB配列によって589bp配列を置き換えるためにツインPEを用いること(最高で40.4%の平均効率)によってもまた切除され得た(図109E)。これらの実験は、ツインPEおよびプライムDelが、より低い平均効率でだが、ペアリングされたCas9ヌクレアーゼの戦略と比較して優れた産物純度でヒト細胞の治療上関係のある遺伝子座における大きい欠失を生成することができるということを示している。

【１３５５】

<u>ツインPEおよびBxB1インテグラーゼによるセーフハーバー遺伝子座における標的化されたDNA取り入れ</u>

ツインPEはPE3よりも大きい挿入編集を行なう能力があるが、配列挿入サイズの上限は、遺伝子サイズのDNA断片の取り入れを支持するためには依然として十分ではなかった。よって、ツインPEを用いて高い効率で内生ヒトゲノム部位にBxB1アタッチメント配列を首尾良く挿入した上で、ツインPEをDNAカーゴの部位特異的取り入れのためにセリンリコンビナーゼと組み合わせた。DNAカーゴ取り入れのための位置付けを同定するためには、HEK293T細胞の確立されたセーフハーバー遺伝子座におけるBxb1のattBおよびattPアタッチメント配列のツインPEによって媒介される挿入である。AAVS1遺伝子座を標的化する32個のスペーサーペアを、50bpのBxb1のattP配列の挿入についてスクリーニングした(データは示さない)。評価されたスペーサーペアのうち、32個のスペーサー組み合わせのうち18個の最適なpegRNAはアンプリコン配列決定によると＞50%の正しい挿入効率を達成した(図110A)。加えて、CCR5遺伝子座を標的化する19個のスペーサーペアを38bpのBxB1のattB配列の挿入についてスクリーニングした(データは示さない)。これらのうち、6つのスペーサーペアはアンプリコン配列決定によると＞50%の所望の編集効率を達成した(図110B)。これらの結果は、ツインPEが、高い効率でヒト細胞のセーフハーバー遺伝子座にリコンビナーゼアタッチメント配列を挿入するために用いられ得るということを実証している。

【１３５６】

次に、ツインPEによって組み込まれるBxB1のattBおよびattP配列を調べて、それらが、パートナーBxB1アタッチメント部位を抱えるプラスミドDNAカーゴの取り入れのための標的部位としての用をなし得るかどうかを決定した。第1に、ツインPEを用いて、ホモ接合のattB部位挿入をCCR5遺伝子座に持つ単細胞クローンを生成した(データは示さない)。BxB1リコンビナーゼを発現するプラスミドおよび5.6kBのattP含有ドナーDNAプラスミドによるこのクローン細胞株のトランスフェクションは、ddPCRによって測定される通り、標的部位における12～17%のノックインを生み出し(図113)、先に報告されたBxb1取り入れ効率と整合した。これらの結果によって促されて、ツインPEによって媒介されるアタッチメント部位挿入およびBxB1によって媒介されるDNAドナー取り入れを調査して、それらが単一のトランスフェクションステップで達成され得るかどうかを決定した。面白いことに、PE2、両方のpegRNA、BxB1、およびドナーDNAをコード

するプラスミドによるHEK293T細胞のトランスフェクションは、ddPCRによって測定される通り、1.4～6.8％のノックイン効率をもたらした(図110C)。予想されるattLおよびattR組み換え産物を含有する予想される接合部配列は、71～95％の範囲である産物純度によるアンプリコン配列決定によって確認された(図114)。

【１３５７】

「ワンポット」ノックイン効率を改善するための努力において、attBまたはattPアタッチメント部位どちらか、古典的(GT)Bxb1コア配列、代替的な(GA)BxB1コア配列、および様々なフラップオーバーラップ長さのツインPEによって媒介される組み込みを試験した。ツインPEによるattB部位の組み込みは、ワンポットノックイントランスフェクションではattP部位の組み込みよりも良い性能であるということが見出された(3.3％対0.5％ノックイン、図110D)。加えて、古典的GTコア配列によるアタッチメント部位の挿入は一般的には代替的なGA配列によるアタッチメント部位の挿入よりも高いノックイン効率に至るということが観察された(図110D、attBの文脈では3.3％対0％)。しかしながら、注意すべきことに、古典的なおよび代替的なコア配列は対応するattPアタッチメント部位との直交的な組み換えを許す。pegRNAによってコードされるリコンビナーゼ配列間のオーバーラップを縮減することは、attBを挿入するときには、38塩基対のオーバーラップによる3.3％から20塩基対のオーバーラップによる5.5％へとノックイン効率をもまた改善した(図110D)。ことによると、pegRNA発現プラスミドDNA配列上のアタッチメント配列の縮減された程度を原因とする。類似のツインPE効率がオーバーラップ長さ間で観察されたが、ドナーDNAおよびpegRNAプラスミドの間の組み換えは縮減された(図115A～115B)。

【１３５８】

次に、ドナー取り入れをALB遺伝子座において評価した。これは肝細胞からの治療用のタンパク質分泌のために採用され得る。アルブミンは肝臓によって活発に分泌され、ヒト血漿タンパク質のおよそ60％を構成する。よって、肝細胞の比較的小さいパーセンテージにおけるALB遺伝子座における治療用のトランスジーン取り入れは、多くの疾患のための治療レベルのタンパク質発現を達成し得る。BxB1が目当てのタンパク質のcDNAによって後続されるスプライスアクセプター配列を含有する環状DNAの取り入れを媒介するであろうALBのイントロン1を標的化する戦略を考案した。取り入れは、原理的には、エキソン1によってコードされるアルブミン分泌シグナルから治療用のトランスジーンコード配列へのスプライシングを許すであろう。第1に、pegRNAペアを、ALBのイントロン1におけるBxb1のattB配列の挿入についてスクリーニングした。pegRNAペアをスクリーニングした後に、アンプリコン配列決定によってattB配列の43％の正しい挿入を達成するスペーサーの組み合わせを同定した(図110E)。この遺伝子座における単回トランスフェクションノックインは、HEK293Tにおいて1.3％の効率で達成された(図110F)。Huh7細胞では、attB配列の34％の正しい挿入が、2.6％の単回トランスフェクションノックイン効率で観察された。興味深いことに、CCR5ノックインはHEK293T細胞においてはALBノックインよりも効率的であるにもかかわらず、Huh7のALBにおけるノックインはCCR5におけるノックインよりも効率的であった(2.6％対1.1％)。

表14．この例に用いられたDNAドナー配列

【表１０１－１】

表14. この例に使用されたDNAドナー配列

DNAドナー	配列	配列番号
attB_Puro_GA donor DNA:	gatgccagctcattcctcccactcatgatctatagatccccgggctgcaggaattctacccactctgtcgataccccaccgagaccc cattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttccccaccccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtc ggggcggcaagcttacatcgagatcccggcttgtcgacgacggcggactccgtcgtcaggatcatccgtgagcaagggcgagga gctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcga gggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgacc accctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaag gctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccc tggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca gccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggca gcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagca cccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactct cggcatggacgagctgtacaagagcggcctgaggagcagagcccaggcgagcaacagcgccgtggacgccaccatgggcga tcgcccgggaattgactagtgcggccgcctaggatccatgccgatagcgttggttgagtggataaccgtattaccgccaagcttatg catgtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccggtgcct agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatata agtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcct ggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttgga agtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggcc gccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcga cgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttggggccgcgggcggcgacggg gcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaag	4282

【表１０１－２】

	ctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccag ttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggc gggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtcc aggcacctcgattagttctcgcgcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactga gtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaa gcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagcccaccatgaccgagtacaagcccacggtgcgcct cgccacccgcgacgacgtccccccgggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccccgccacgcgccacaccgtcg acccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcacgcgcgtcgggctcgacatcggcaaggtgtggg tcgcggacgacggcgccgcggtggcggtctggaccacgccggagagcgtcgaagcgggggcggtgttcgccgagatcggcc cgcgcatggccgagttgagcggttcccggctggccgcgcagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggcccaagga gcccgcgtggttcctggccaccgtcggcgtctcgcccgaccaccagggcaagggtctgggcagcgccgtcgtgctccccggagt ggaggcggccgagcgccgcggggtgcccgccttcctggagacctccgcgcccccgcaacctccccttctacgagcggctcggctt caccgtcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgacccgcaagcccggtgccggatcgggagag ggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaccggtcgccaccagcgagctgattaaggagaac atgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtggacaaccatcacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgag ggcacccagaccatgagaatcaaggtggtcgagggcggccctctccccttcgccttcgacatcctggctactagcttcctctacggc agcaagaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttcttcaagcagtccttccctgagggcttcacatgggagagagtcac cacatacgaagacgggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatcag aggggtgaacttcacatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggccttcaccgagacgctgtaccccgct gacggcggcctggaaggcagaaacgacatggccctgaagctcgtgggcgggagccatctgatcgcaaacatcaagaccacatat agatccaagaaacccgctaagaacctcaagatgcctggcgtctactatgtggactacagactggaaagaatcaaggaggccaaca acgagacctacgtcgagcagcacgaggtggcagtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaagcttaattaaga attctctagaggatccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtg aaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcag ggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatcctgcaagcctcgtcgccgcgg tttattctgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgggatcggccattg aacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacgatcggctg ctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaact gcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcggg aagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggc tgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgta ctcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggct caaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgc ttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagc ttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgccccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgac gagttcttctgagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaattcggtaccaataa aagagctttatttcatgatctgtgttggttttggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctc tcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggta tctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaac tatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgta ggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccag ttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctagtgtgcg	
attB_Puro donor DNA:	gatgccagctcattcctcccactcatgatctatagatccccgggctgcaggaattctacccactctgtcgataccccaccgagaccc cattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttccccaccccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtc ggggcggcaagcttacatcgagatcccggcttgtcgacgacggcggtctccgtcgtcaggatcatccgtgagcaagggcgagga gctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcga gggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgacc accctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaag gctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccc tggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaaca gccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggca gcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagca cccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactct cggcatggacgagctgtacaagagcggcctgaggagcagagcccaggcgagcaacagcgccgtggacgccaccatgggcga tcgcccgggaattgactagtgcggccgcctaggatccatgccgatagcgttggttgagtggataaccgtattaccgccaagcttatg catgtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcct agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttttcccgagggtgggggagaaccgtatata agtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcct	4283

【表１０１－３】

	ggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttgga agtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggcc gccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcga cgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcgggcggcgacgggg gcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaag ctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccag ttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggc gggtgagtcacccacacaaaggaaaaggggcctttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtcc aggcacctcgattagttctcgcgcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactga gtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctcaa gcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagcccaccatgaccgagtacaagcccacggtgcgcct cgccacccgcgacgacgtcccccgggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccccgccacgcgccacaccgtcg acccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcacgcgcgtcgggctcgacatcggcaaggtgtggg tcgcggacgacggcgccgcggtggcggtctggaccacgccggagagcgtcgaagcgggggcggtgttcgccgagatcggcc cgcgcatggccgagttgagcggttcccggctggccgcgcagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggcccaagga gcccgcgtggttcctggccaccgtcggcgtctcgcccgaccaccagggcaagggtctgggcagcgccgtcgtgctccccggagt ggaggcggccgagcgcgccggggtgcccgccttcctggagacctccgcgccccgcaacctccccttctacgagcggctcggctt caccgtcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgacccgcaagcccggtgccggatcgggagag ggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaccggtcgccaccagcgagctgattaaggagaac atgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtggacaaccatcacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagccctacgag ggcacccagaccatgagaatcaaggtggtcgagggcggccctctcccttcgccttcgacatcctggctactagcttcctctacggc agcaagaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttcttcaagcagtccttccctgagggcttcacatgggagagagtcac cacatacgaagacgggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtcaagatcag aggggtgaacttcacatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggccttcaccgagacgctgtaccccgct gacggcggcctggaaggcagaaacgacatggccctgaagctcgtgggcgggagccatctgatcgcaaacatcaagaccacatat agatccaagaaacccgctaagaacctcaagatgccctggcgtctactatgtggactacagactggaaagaatcaaggaggccaaca acgagacctacgtcgagcagcacgaggtggcagtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaagcttaattaaga attctctagaggatccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtg aaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcag ggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatcctgcaagcctcgtcgccgcgg tttattctgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatgggatcggccattg aacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacgatcggctg ctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttcttttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaact gcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcggg aagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggc tgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgta ctcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggct caaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgc ttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagc ttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgccccgattcgcagcgcatcgccttctatcgccttcttgac gagttcttctgagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaattcggtaccaataa aagagctttattttcatgatctgtgtgttggtttttggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctc tcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggta tctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaac tatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgta ggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccag ttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctagtgtgcg	
attP_Puro_GA donor DNA:	gatgccagctcattcctcccactcatgatctatagatccccgggctgcaggaattctacccactctgtcgataccccaccgagaccc cattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttccccaccccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtc ggggcggcaagcttacatcgagatcccggtttgtctggtcaaccaccgcggactcagtggtgtacggtacaaaccccgtgagcaa gggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccgg cgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccac cctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgcca tgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagg gcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtac aactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcg aggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccac tacctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgcc	4284

【表１０１－４】

	gggatcactctcggcatggacgagctgtacaagagcggcctgaggagcagagcccaggcgagcaacagcgccgtggacgcca ccatgggcgatcgcccgggaattgactagtgcggccgcctaggatccatgccgatagcgttggttgagtggataaccgtattaccg ccaagcttatgcatgtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggggtcggcaattg aaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggtt cccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgag cttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgg gcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcacccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatg acctgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcgggg cggcgacgggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggg gtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccg gtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgg gagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaaggggccttttcgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccg ggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgcgcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttc cccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttg gttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagcccaccatgaccgagtacaagccca cggtgcgcctcgccacccgcgacgacgtccccgggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccccgccacgcgc cacaccgtcgacccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcacgcgcgtcgggctcgacatcggc aaggtgtgggtcgcggacgacggcgccgcggtggcggtctggaccacgccggagagcgtcgaagcgggggcggtgttcgcc gagatcggcccgcgcatggccgagttgagcggttcccggctggccgcgcagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccg gcccaaggagcccgcgtggttcctggccaccgtcggcgtctcgcccgaccaccagggcaagggtctgggcagcgccgtcgtgc tccccggagtggaggcggccgagcgcgccggggtgcccgccttcctggagacctccgcgccccgcaacctccccttctacgag cggctcggcttcaccgtcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgacccgcaagcccggtgccgg atcgggagagggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaccggtcgccaccagcgagctga ttaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtggacaaccatcacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaa gccctacgagggcacccagaccatgagaatcaaggtggtcgagggcggcctctccccttcgccttcgacatcctggctactagct tcctctacggcagcaagaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttcttcaagcagtccttccctgagggcttcacatggg agagagtcaccacatacgaagacggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacg tcaagatcagaggggtgaacttcacatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggccttcaccgagacgct gtaccccgctgacggcggcctggaaggcagaaacgacatggccctgaagctcgtgggcgggagccatctgatcgcaaacatca agaccacatatagatccaagaaacccgctaagaacctcaagatgcctggcgtctactatgtggactacagactggaaagaatcaag gaggccaacaacgagacctacgtcgagcagcacgaggtggcagtggccagatactgcgacctccctagcaaactggggcacaa gcttaattaagaattctctagaggatccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaa atgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttat gtttcaggttcaggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatcctgcaagcc tcgtcgccgcggtttattctgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatg ggatcggccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaaca gacgatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgc cctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtc actgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagt atccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcga gcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaact gttcgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtg gaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgat attgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgccccgattcgcagcgcatcgccttct atcgccttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaat tcggtaccaataaaagagctttatttttcatgatctgtgtgttggtttttggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgcccccctgac gagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcccccctggaagct ccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagct cacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcg ccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagca gagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcg ctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgttt gcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctagtgtgcg	
attP_Puro donor DNA:	gatgccagctcattcctcccactcatgatctatagatccccgggctgcaggaattctacccactctgtcgataccccaccgagaccc cattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttccccaccccaccccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaacgtc ggggcggcaagcttacatcgagatcccggtttgtctggtcaaccaccgcggtctcagtggtgtacggtacaaacccgtgagcaag ggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggc gagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacc ctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccat	4285

10

20

30

40

50

【表１０１－５】

	gcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgaggg cgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaa ctacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgag gacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccacta cctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgg gatcactctcggcatggacgagctgtacaagagcggcctgaggagcagagcccaggcgagcaacagcgccgtggacgccacc atgggcgatcgcccgggaattgactagtgcggccgcctaggatccatgccgatagcgttggttgagtggataaccgtattaccgcc aagcttatgcatgtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcccgagaagttgggggggagggggtcggcaattgaa ccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttttcccgagggtgggggaga accgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcc cgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagctt cgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcg ctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacc tgctgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttgggggccgcgggcg gcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggacgggggt agtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggt cggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggga gagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggccttccgtcctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccggg cgccgtccaggcacctcgattagttctcgcgcttttggagtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccc cacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggtt cattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtgagctagcccaccatgaccgagtacaagcccacg gtgcgcctcgccacccgcgacgacgtcccccgggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccccgccacgcgcca caccgtcgacccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcacgcgcgtcgggctcgacatcggcaa ggtgtgggtcgcggacgacggcgccgcggtggcggtctggaccacgccggagagcgtcgaagcgggggcggtgttcgccga gatcggcccgcgcatggccgagttgagcggttcccggctggccgcgcagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggc ccaaggagcccgcgtggttcctggccaccgtcggcgtctcgcccgaccaccagggcaagggtctgggcagcgccgtcgtgctcc ccggagtggaggcggccgagcgcgccggggtgcccgccttcctggagacctccgcgccccgcaacctccccttctacgagcgg ctcggcttcaccgtcaccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgacccgcaagcccggtgccggatc gggagagggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaccggtcgccaccagcgagctgatta aggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtggacaaccatcacttcaagtgcacatccgagggcgaaggcaagc cctacgagggcacccagaccatgagaatcaaggtggtcgagggcggccctctcccctgccttcgacatcctggctactagcttc ctctacggcagcaagaccttcatcaaccacacccagggcatccccgacttcttcaagcagtccttccctgagggcttcacatgggag agagtcaccacatacgaagacggggcgtgctgaccgctacccaggacaccagcctccaggacggctgcctcatctacaacgtc aagatcagaggggtgaacttcacatccaacggccctgtgatgcagaagaaaacactcggctgggaggccttcaccgagacgctgt accccgctgacggcggcctggaaggcagaaacgacatggccctgaagctcgtgggcgggagccatctgatcgcaaacatcaag accacatatagatccaagaaacccgctaagaacctcaagatgcctggcgtctactatgtggactacagactggaaagaatcaagga ggccaacaacgagacctacgtcgagcagcacgaggtggcagtggccagatactgcgacctccctagcaaactgggcacaagc ttaattaagaattctctagaggatccagacatgataagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatg ctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcatttttatgtt tcaggttcaggggggaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatcctgcaagcctcg tcgccgcggtttattctgttgacaattaatcatcggcatagtatatcggcatagtataatacgacaaggtgaggaactaaaccatggga tcggccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagac gatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccct gaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgttccttgcgcagctgtgctcgacgttgtcact gaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatc catcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgcttgatccggctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagc gagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgtt cgccaggctcaaggcgcgcatgcccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaa aatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattg ctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgccccgattcgcagcgcatcgccttctatc gccttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaataaagaccgaccaagcgacgtctgagagctccctggcgaattcg gtaccaataaaagagctttattttcatgatctgtgtgttggttttggccgcgttgctggcgttttttccataggctccgccccccctgacgag catcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccct cgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcac gctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgcctt atccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagag cgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctct gctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgca agcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctagtgtgcg	

【１３５９】

多重編集およびリコンビナーゼによって媒介される逆位

重症の血友病Aケースの～５０％を引き起こすF８遺伝子座の大きい0.６Mb逆位などの大きい構造バリアントは、多くのヒト病原性アレルにおいて見出される。ツインPEを用いるリコンビナーゼアタッチメント部位挿入の高い効率に着想を得て、attBおよびattP両方のBxb1アタッチメント部位の挿入を多重化することが、介在DNA配列の一方向的な欠失または逆位によってより複雑な遺伝子バリアントを修正するために用いられ得るということが推論された。治療上関係のある遺伝子座においてこのアプローチを試験するために、IDSおよびその偽遺伝子IDS２の間における３９kb逆位を試みた。これらの部位間の逆

位はハンター症候群のケースの～13％で観察され、病原性のアレルにおける切断点のキャラクタリゼーションは、逆位が多くの場合にIDSおよびIDS2両方に存在するイントロン7の組み換えホットスポットにおいて生起するということを明らかにしている。よって、これらの組み換えホットスポットをフランキングする領域を標的化して、BxB1のattPおよびattBアタッチメント配列を挿入した。これらは、対向する方向を向いたときには、患者細胞の病原性アレル配列の修正のためのBxB1による一方向的な逆位の基質として用いられ得る(図111A)。12個のpegRNAスペーサーペアをスクリーニングし、pegRNA配列フィーチャを最適化した後に、それぞれ73.7％および69.8％の効率で左および右の標的部位にattPまたはattBアタッチメント部位を挿入することができるpegRNAペアが見出された(図111B)。

【1360】

次に、attPおよびattBアタッチメント部位両方のツインPEによって媒介される挿入を多重化することは、IDSおよびIDS2における39kb配列のBxB1リコンビナーゼによって媒介される逆位で調査した。当初は、逐次的なDNAトランスフェクションを、ツインPE構成要素、次にBxb1リコンビナーゼによって調査した。IDS2のイントロン3上の順向きのattP配列およびIDSのイントロン7上の逆向きのattB配列を組み入れるpegRNAの第1のセット(セット1)を試験した。加えて、pegRNAの第2のセット(セット2)を用いて、第1のトランスフェクションによって、IDS2上の逆向きのattP配列およびIDS上の順向きのattB配列を組み入れた。52.3％または54.5％のattP配列挿入および27.6％または30.9％のattB配列挿入がそれぞれpegRNAセット1およびセット2による多重編集について観察された(図111C)。編集された細胞を続くBxb1リコンビナーゼによってトランスフェクションしたときには、モックトランスフェクション対照と比較して、attPおよびattB配列を含有する増幅されたアレルの有意に減少したパーセンテージが観察され(p値＜0.05)、いくつかの編集されたアレルはBxB1によって媒介される組み換えの基質として用いられているということを示唆した(図111C)。予期される逆位接合部の増幅、次にアンプリコン配列決定は、両方の接合部において80％のまたはそれよりも上の産物純度で、BxB1によって媒介される組み換えのattLおよびattR配列シグネチャー両方を示した(図111D)。

【1361】

ワンポットツインPEおよびBxb1によって媒介される逆位を実行し、pegRNAプラスミドDNA間の無用の組み換えを迂回するために、PE2のmRNA、セット1からの合成pegRNA、およびBxb1のmRNAを含む全てRNAの構成要素をヌクレオフェクションした。アンプリコン配列決定を用いて、attRおよびattL配列を含有する予想される逆位したアレル接合部を捕捉した。さらにその上、逆位効率を定量するために、逆位していないおよび逆位した両方のアレル上の同一の配列に結合、よって同じプライマーペアを用いて両方の編集を増幅し得るリバースプライマーをデザインした(図116)。～4.6～7.2％および～1.5～2.3％の逆位効率が、それぞれ「逐次的な」および「ワンポット」戦略について観察された(図111E)。まとめて、これらのデータは、ツインPEを部位特異的セリンリコンビナーゼと組み合わせることが、ハンター症候群アレルに見出される普通の39kb逆位を修正するために用いられ得、他の複雑な病原性のバリアントを標的化するための有望な治療プラットホームとしての用をなし得るということを支持する。

【1362】

考察

本願において提示される通り、ヒト細胞のゲノム上の標的化された位置付けにおいてDNA配列を欠失させるか、置き換えるか、または挿入するために用いられ得るツインプライム編集アプローチを開発した。部位特異的セリンリコンビナーゼ酵素と組み合わせられるときには、ツインPEはDNAカーゴの取り入れまたはDNA配列の逆位をもまた支持し得る。

【1363】

方法

一般的な方法

別様に注意されない限り、DNA増幅は、Phusion U Green多重PCRマスターミックス(ThermoFisher Scientific)またはQ5ホットスタートハイフィデリティ2×マスターミックス(New England BioLabs)を用いるPCRによって実施した。DNAオリゴヌクレオチドはIntegrated DNA Technologiesから得た。sgRNAを発現するプラスミドは、BsmBI消化されたアクセプターベクター上へのアニールしたオリゴヌクレオチドのライゲーションによって構築した。pegRNAを発現するプラスミドは、先に記載された通りGibsonアセンブリまたはGolden Gateアセンブリによって構築した。この例に用いられたsgRNAおよびpegRNA構築物の配列は表11～12に列記されている。

表11．この例に用いられたsgRNAの配列

【表１０２】

表11. この例に使用されたsgRNAの配列

sgRNA	スペーサー配列	配列番号
HEK3_3b_+90_nicking	GTCAACCAGTATCCCGGTGC	616
pU6-Sp-sgRNA-DMDExo51-A1	GATTGGCTTTGATTTCCCTA	3971
pU6-Sp-sgRNA-DMDExo51-A3	GTATATGATTGTTACTGAGA	3972
pU6-Sp-sgRNA-DMDExo51-B1	Gcagttgcctaagaactggt	3973

表12．この例に用いられたpegRNAの配列

【表１０３－１】

pegRNA	スペーサー配列	スペーサー配列番号	3' 伸長	伸長配列番号
HEK3_attB_A_38	ggcccagactgagcacgtga	383	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCGTGCTCAGTCTG	4029
HEK3_attB_A_34	ggcccagactgagcacgtga	383	TCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCGTGCTCAGTCTG	4030
HEK3_attB_A_30	ggcccagactgagcacgtga	383	GACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCGTGCTCAGTCTG	4031
HEK3_attB_B_38	gtcaaccagtatcccggtgc	616	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGATACTGG	4032
HEK3_attB_B_34	gtcaaccagtatcccggtgc	616	TGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGATACTGG	4033
HEK3_attB_B_30	gtcaaccagtatcccggtgc	616	GACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGATACTGG	4034

【表１０３－２】

HEK3_attP_A_43	ggcccagactgagcacgtga	383	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGCTCAGTCTG	4035
HEK3_attP_A_39	ggcccagactgagcacgtga	383	GTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGCTCAGTCTG	4036
HEK3_attP_A_35	ggcccagactgagcacgtga	383	ACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGCTCAGTCTG	4037
HEK3_attP_B_44	gtcaaccagtatcccggtgc	616	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCGGGATACTGG	4038
HEK3_attP_B_40	gtcaaccagtatcccggtgc	616	GGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCGGGATACTGG	4039
HEK3_attP_B_36	gtcaaccagtatcccggtgc	616	AACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCGGGATACTGG	4040
PE3_HEK3_FKBP_ins12bp	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcacacctgcactcccgtgctcagtctg	4041
PE3_HEK3_FKBP_ins36bp	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcacccgtctccttggggagatggtttccacctgcactcccgtgctcagtctg	4042
PE3_HEK3_FKBP_ins108bp	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcaaaatttctttccatcttcaagcatcccggtgtagtgcaccacgcaggtctggccgcgcttggggaaggtgcgcccgtctcctggggagatggtttccacctgcactcccgtgctcagtctg	4043
PE3_HEK3_FKBP_ins321bp	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcattccagttttagaagctccacatcgaagacgagagtggcatgtggtgggatgatgcctgggtgcccagtggcaccataggcataatctggagatatagtcagtttggctctctgacccacactcatctgggcaacccttcttcccagcctcggatcacctcctgcttgcctagcataaacttaaagggcttgtttctgtcccgggaggaatcaaatttctttccatcttcaagcatcccggtgtagtgcaccacgcaggtctggccgcgcttggggaaggtgcgcccgtctcctggggagatggtttcacctgcactcccgtgctcagtctg	4044
twinPE_HEK3_FKBP_ins108bp_32bp_overhang_A	ggcccagactgagcacgtga	383	accacgcaggtctggccgcgcttggggaaggtgcgcccgtctcctggggagatggtttccacctgcactcccgtgctcagtctg	4045
twinPE_HEK3_FKBP_ins108bp_32bp_overhang_B	gtcaaccagtatcccggtgc	616	accttccccaagcgcggccagacctgcgtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaatttccgggatactgg	4046
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_13nt TEMP_Basic	ggcccagactgagcacgtga	383	tcctctgccatcacgtgctcagtctg	4047
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_13nt TEMP_Basic	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggaccgggatactgg	4048
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_34nt TEMP_Basic	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcacgtgctcagtctg	4049
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_34nt TEMP_Basic	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggaaaggaagccctgcttcctccaccgggatactgg	4050
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_13-13TEMP_Hybrid	ggcccagactgagcacgtga	383	tgcaggagctgcatcctctgccatcacgtgctcagtctg	4051
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_13-13TEMP_Hybrid	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggatgcagctcctgcaccgggatactgg	4052
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_31nt TEMP_Shendure	ggcccagactgagcacgtga	383	gcccagccaaacttgtcaaccagtatcccggcgtgctcagtctg	4053

【表１０３－３】

pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_31nt TEMP_Shendure	gtcaaccagtatcccggtgc	616	gggtcaatccttggggcccagactgagcacgccgggatactgg	4054
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_13nt TEMP_Basic_EvoPreQ1	ggcccagactgagcacgtga	383	tcctctgccatcacgtgctcagtctgTTAAATAACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4055
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_13nt TEMP_Basic_EvoPreQ1	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggaccgggatactggAAAATATACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4056
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_34nt TEMP_Basic_EvoPreQ1	ggcccagactgagcacgtga	383	tggaggaagcagggcttcctttcctctgccatcacgtgctcagtctgTTAATAATCGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4057
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_34nt TEMP_Basic_EvoPreQ1	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggaaaggaagccctgcttcctccaccgggatactggAAAAAAAACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4058
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_13-13TEMP_Hybrid_EvoPreQ1	ggcccagactgagcacgtga	383	tgcaggagctgcatcctctgccatcacgtgctcagtctgATAAATAACGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4059
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_13-13TEMP_Hybrid_EvoPreQ1	gtcaaccagtatcccggtgc	616	tgatggcagaggatgcagctcctgcaccgggatactggAAAAAAAGGCGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4060
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_A_31nt TEMP_Shendure_EvoPreQ1	ggcccagactgagcacgtga	383	gcccagccaaacttgtcaaccagtatcccggcgtgctcagtctgTTAAATACCGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4061
pU6-Sp-gRNA-HEK3_del_DF_B_31nt TEMP_Shendure_EvoPreQ1	gtcaaccagtatcccggtgc	616	gggtcaatccttggggcccagactgagcacgccgggatactggAAAATAATCGCGGTTCTATCTAGTTACGCGTTAAACCAACTAGAA	4062
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A1_a_Basic	GATTGGCTTTGATTTCCCTA	3971	ttgaataggaagtaaattaatttgaagctggaccctagGGAAATCAA	4063
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A1_b_Basic	GATTGGCTTTGATTTCCCTA	3971	ttgaataggaagtaaattaatttgaagctggaccctagGGAAATCAAAG	4064
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A1_c_Basic	GATTGGCTTTGATTTCCCTA	3971	ttgaataggaagtaaattaatttgaagctggaccctagGGAAATCAAAGCC	4065
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B1_A1_b_Basic	Gcagttgcctaagaactggt	3973	tagggtccagcttcaaattaatttacttcctattcaaagttcttaggc	4066
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B1_A1_c_Basic	Gcagttgcctaagaactggt	3973	tagggtccagcttcaaattaatttacttcctattcaaagttcttaggcaa	4067
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A3_c_Basic	GTATATGATTGTTACTGAGA	3972	atgcctggacaagtaacttaagttaaataagccttctCAGTAACAATCAT	4068
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B1_A3_a_Basic	Gcagttgcctaagaactggt	3973	agaaggcttatttaacttaagttacttgtccaggcatagttcttag	4069
pu6-sp-pegrna-dmdexo51-a3-b1_a_PrimeDel	GTATATGATTGTTACTGAGA	3972	tgctgagagagaaacagttgcctaagaactCAGTAACAAT	4070
pu6-sp-pegrna-dmdexo51-b1-a3_a-PrimeDel	Gcagttgcctaagaactggt	3973	accacttccacaatgtatatgattgttactgagttcttagg	4071

【表１０３－４】

pu6-sp-pegrna-dmdexo51-b1-a3_b-PrimeDel	Gcagttgcctaagaactggt	3973	accacttccacaatgtatatgattgttactgagttcttaggcaa	4072
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A3_b_attB_fwd	GTATATGATTGTTACTGAGA	3972	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCAGTAACAATC	4073
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-A3_c_attB_fwd	GTATATGATTGTTACTGAGA	3972	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCAGTAACAATCATA	4074
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B1_b_attB_fwd	Gcagttgcctaagaactggt	3973	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATagttcttaggc	4075
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B1_c_attB_fwd	Gcagttgcctaagaactggt	3973	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATagttcttaggcaac	4076
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B2_b_attB_fwd	Gaggagagtaaagtgattgg	3974	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATatcactttactc	4077
pU6-Sp-pegRNA-DMDExo51-B2_c_attB_fwd	Gaggagagtaaagtgattgg	3974	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATatcactttactctcc	4078
A_1077a	GCAGAGCCAGGAACCCCTGT	3975	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGGTTCCT	4079
A_1077b	GCAGAGCCAGGAACCCCTGT	3975	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGGTTCCTGG	4080
A_1077c	GCAGAGCCAGGAACCCCTGT	3975	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGGTTCCTGGCT	4081
A_1098a	GGGAAGGGGCAGGAGAGCCA	3976	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCTCCTGC	4082
A_1098b	GGGAAGGGGCAGGAGAGCCA	3976	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCTCCTGCCC	4083
A_1098c	GGGAAGGGGCAGGAGAGCCA	3976	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCTCCTGCCCCT	4084
A_1246a	GAATATGTCCCAGATAGCAC	3977	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTATCTGGG	4085
A_1246b	GAATATGTCCCAGATAGCAC	3977	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTATCTGGGAC	4086
A_1246c	GAATATGTCCCAGATAGCAC	3977	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTATCTGGGACAT	4087
A_1267a	GGGGACTCTTTAAGGAAAGA	3978	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTTCCTTAAA	4088
A_1267b	GGGGACTCTTTAAGGAAAGA	3978	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTTCCTTAAAGA	4089
A_1267c	GGGGACTCTTTAAGGAAAGA	3978	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTTCCTTAAAGAGT	4090

【表１０３－５】

A_1293a	GAGAAAGAGAAAGGGAGTAG	3979	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCCCTTTC	4091
A_1293b	GAGAAAGAGAAAGGGAGTAG	3979	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCCCTTTCTC	4092
A_1293c	GAGAAAGAGAAAGGGAGTAG	3979	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTCCCTTTCTCTT	4093
A_1307a	GAGTAGAGGCGGCCACGACC	3980	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGGCCGC	4094
A_1307b	GAGTAGAGGCGGCCACGACC	3980	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGGCCGCCT	4095
A_1307c	GAGTAGAGGCGGCCACGACC	3980	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGTGGCCGCCTCT	4096
A_1582a	GATCAGTGAAACGCACCAGA	3981	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGTGCGTTT	4097
A_1582b	GATCAGTGAAACGCACCAGA	3981	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGTGCGTTTCA	4098
A_1582c	GATCAGTGAAACGCACCAGA	3981	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGTGCGTTTCACT	4099
A_1615a	GCAGCTCAGGTTCTGGGAGA	3982	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCCAGAACC	4100
A_1615b	GCAGCTCAGGTTCTGGGAGA	3982	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCCAGAACCTG	4101
A_1615c	GCAGCTCAGGTTCTGGGAGA	3982	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCCAGAACCTGAG	4102
A_1647a	GTGGCCACTGAGAACCGGGC	3983	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGGTTCTCA	4103
A_1647b	GTGGCCACTGAGAACCGGGC	3983	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGGTTCTCAGT	4104
A_1647c	GTGGCCACTGAGAACCGGGC	3983	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCGGTTCTCAGTGG	4105
A_1810a	GAATCTGCCTAACAGGAGGT	3984	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTCCTGTTAG	4106
A_1810b	GAATCTGCCTAACAGGAGGT	3984	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTCCTGTTAGGC	4107
A_1810c	GAATCTGCCTAACAGGAGGT	3984	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTTCCTGTTAGGCAG	4108
A_1890a	GTCACCAATCCTGTCCCTAG	3985	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGACAGGA	4109

【表１０３－６】

A_1890b	GTCACCAATCCTGTCCCTAG	3985	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGACAGGATT	4110
A_1890c	GTCACCAATCCTGTCCCTAG	3985	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGACAGGATTGG	4111
A_3786a	GCTGGCCCCCCACCGCCCCA	3986	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCGGTGGG	4112
A_3786b	GCTGGCCCCCCACCGCCCCA	3986	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCGGTGGGGG	4113
A_3786c	GCTGGCCCCCCACCGCCCCA	3986	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCGGTGGGGGGC	4114
A_3835a	GACGTCACGGCGCTGCCCCA	3987	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCAGCGCC	4115
A_3835b	GACGTCACGGCGCTGCCCCA	3987	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCAGCGCCGT	4116
A_3835c	GACGTCACGGCGCTGCCCCA	3987	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCAGCGCCGTGA	4117
A_3856a	GGTGTGCTGGGCAGGTCGCG	3988	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGACCTGCCC	4118
A_3856b	GGTGTGCTGGGCAGGTCGCG	3988	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGACCTGCCCAG	4119
A_3856c	GGTGTGCTGGGCAGGTCGCG	3988	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGACCTGCCCAGCA	4120
B_1154a	GTCCTTGGCAAGCCCAGGAG	3989	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGGGCTTG	4121
B_1154b	GTCCTTGGCAAGCCCAGGAG	3989	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGGGCTTGCC	4122
B_1154c	GTCCTTGGCAAGCCCAGGAG	3989	cTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGGGCTTGCCAA	4123
B_1314a	GTGCGTCCTAGGTGTTCACC	3990	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAACACCTA	4124
B_1314b	GTGCGTCCTAGGTGTTCACC	3990	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAACACCTAGG	4125
B_1314c	GTGCGTCCTAGGTGTTCACC	3990	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAACACCTAGGAC	4126
B_1376a	GTCCTGGCAGGGCTGTGGTG	3991	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACAGCCCT	4127
B_1376b	GTCCTGGCAGGGCTGTGGTG	3991	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACAGCCCTGC	4128

【表１０３－７】

B_1376c	GTCCTGGCAGGGCTGTGGTG	3991	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACAGCCCTGCCA	4129
B_1640a	GTGACCTGCCCGGTTCTCAG	3992	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGAACCGGG	4130
B_1640b	GTGACCTGCCCGGTTCTCAG	3992	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGAACCGGGCA	4131
B_1640c	GTGACCTGCCCGGTTCTCAG	3992	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGAACCGGGCAGG	4132
B_1676a	GAGCTTGGCAGGGGGTGGGA	3993	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACCCCCTG	4133
B_1676b	GAGCTTGGCAGGGGGTGGGA	3993	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACCCCCTGCC	4134
B_1676c	GAGCTTGGCAGGGGGTGGGA	3993	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCACCCCCTGCCAA	4135
B_1701a	GAGCCAGAGAGGATCCTGGG	3994	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGGATCCTC	4136
B_1701b	GAGCCAGAGAGGATCCTGGG	3994	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGGATCCTCCTC	4137
B_1701c	GAGCCAGAGAGGATCCTGGG	3994	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTAGGATCCTCTCTG	4138
B_1705a	GATGGAGCCAGAGAGGATCC	3995	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTCCTCTCTG	4139
B_1705b	GATGGAGCCAGAGAGGATCC	3995	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTCCTCTCTGGC	4140
B_1705c	GATGGAGCCAGAGAGGATCC	3995	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTCCTCTCTGGCTC	4141
B_1883a	GGGGCCACTAGGGACAGGAT	3996	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGTCCCTA	4142
B_1883b	GGGGCCACTAGGGACAGGAT	3996	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGTCCCTAGT	4143
B_1883c	GGGGCCACTAGGGACAGGAT	3996	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGTCCCTAGTGG	4144
B_1902a	GTCCCCTCCACCCCACAGTG	3997	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGTGGGGTG	4145
B_1902b	GTCCCCTCCACCCCACAGTG	3997	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGTGGGGTGGA	4146
B_1902c	GTCCCCTCCACCCCACAGTG	3997	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGTGGGGTGGAGG	4147

【表１０３－８】

B_1962a	GGGACCACCTTATATTCCCA	3998	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAATATAAG	4148
B_1962b	GGGACCACCTTATATTCCCA	3998	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAATATAAGGT	4149
B_1962c	GGGACCACCTTATATTCCCA	3998	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGAATATAAGGTGG	4150
B_3839a	GACCTGCCCAGCACACCCTG	3999	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGGTGTGCTG	4151
B_3839b	GACCTGCCCAGCACACCCTG	3999	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGGTGTGCTGGG	4152
B_3839c	GACCTGCCCAGCACACCCTG	3999	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGGTGTGCTGGGCA	4153
B_3903a	GCGACTCCTGGAAGTGGCCA	4000	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCACTTCCA	4154
B_3903b	GCGACTCCTGGAAGTGGCCA	4000	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCACTTCCAGG	4155
B_3903c	GCGACTCCTGGAAGTGGCCA	4000	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCACTTCCAGGAG	4156
B_3930a	GGACTTCCCAGTGTGCATCG	4001	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGCACACTG	4157
B_3930b	GGACTTCCCAGTGTGCATCG	4001	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGCACACTGGG	4158
B_3930c	GGACTTCCCAGTGTGCATCG	4001	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGCACACTGGGAA	4159
A_1_223_a	TTTGCAGTTTATCAGGATGA	4002	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGCAGTTTATC	4160
A_1_223_b	TTTGCAGTTTATCAGGATGA	4002	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGCAGTTTATCAG	4161
A_1_223_c	TTTGCAGTTTATCAGGATGA	4002	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGCAGTTTATCAGG	4162
A_2_260_a	GGTTGAGCAGGTAGATGTCA	4003	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCAGGT	4163
A_2_260_b	GGTTGAGCAGGTAGATGTCA	4003	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCAGGTAG	4164
A_2_260_c	GGTTGAGCAGGTAGATGTCA	4003	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCAGGTAGAT	4165
A_3_325_a	CTGGGCGGCAGCATAGTGAG	4004	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCGGCAGC	4166

【表１０３－９】

A_3_325_b	CTGGGCGGCAGCATAGTGAG	4004	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCGGCAGCAT	4167
A_3_325_c	CTGGGCGGCAGCATAGTGAG	4004	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCGGCAGCATAG	4168
A_4_360_a	GTCAAGAGTTGACACATTGT	4005	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGAGTTGAC	4169
A_4_360_b	GTCAAGAGTTGACACATTGT	4005	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGAGTTGACAC	4170
A_4_360_c	GTCAAGAGTTGACACATTGT	4005	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGAGTTGACACA	4171
A_5_507_a	CCCAAGTGATCACACTTGTC	4006	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGTGATCAC	4172
A_5_507_b	CCCAAGTGATCACACTTGTC	4006	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGTGATCACAC	4173
A_5_507_c	CCCAAGTGATCACACTTGTC	4006	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGTGATCACACTT	4174
A_6_510_a	CCACCCAAGTGATCACACTT	4007	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCCCAAGTGA	4175
A_6_510_b	CCACCCAAGTGATCACACTT	4007	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCCCAAGTGATC	4176
A_6_510_c	CCACCCAAGTGATCACACTT	4007	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCCCAAGTGATCAC	4177
A_7_532_a	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCA	4178
A_7_532_b	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4179
A_7_532_c	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAACA	4180
B_1_272_a	TCTCTGACCTGTTTTTCCTT	4009	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTGACCTG	4181
B_1_272_b	TCTCTGACCTGTTTTTCCTT	4009	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTGACCTGT	4182
B_1_272_c	TCTCTGACCTGTTTTTCCTT	4009	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTGACCTGTTT	4183
B_2_291_a	TCTTACTGTCCCCTTCTGGG	4010	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATTACTGTCCC	4184
B_2_291_b	TCTTACTGTCCCCTTCTGGG	4010	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATTACTGTCCCCT	4185
B_2_291_c	TCTTACTGTCCCCTTCTGGG	4010	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATTACTGTCCCCTTC	4186
B_3_305_a	TCTGGGCTCACTATGCTGCC	4011	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGGCTCACT	4187
B_3_305_b	TCTGGGCTCACTATGCTGCC	4011	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGGCTCACTAT	4188

【表１０３－１０】

B_3_305_c	TCTGGGCTCACTATGCTGCC	4011	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGGCTCACTATGC	4189
B_4_326_a	CCCAGTGGGACTTTGGAAAT	4012	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTGGGACT	4190
B_4_326_b	CCCAGTGGGACTTTGGAAAT	4012	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTGGGACTTTG	4191
B_4_326_c	CCCAGTGGGACTTTGGAAAT	4012	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTGGGACTTTGG	4192
B_5_330_a	GTGGGACTTTGGAAATACAA	4013	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGACTTTGG	4193
B_5_330_b	GTGGGACTTTGGAAATACAA	4013	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGACTTTGGAA	4194
B_5_330_c	GTGGGACTTTGGAAATACAA	4013	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGGACTTTGGAAAT	4195
B_6_414_a	CCTGACAATCGATAGGTACC	4014	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGACAATCGA	4196
B_6_414_b	CCTGACAATCGATAGGTACC	4014	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGACAATCGATA	4197
B_6_414_c	CCTGACAATCGATAGGTACC	4014	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGACAATCGATAGG	4198
B_7_538_a	GGAATCATCTTTACCAGATC	4015	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATATCATCTTTA	4199
B_7_538_b	GGAATCATCTTTACCAGATC	4015	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATATCATCTTTACC	4200
B_7_538_c	GGAATCATCTTTACCAGATC	4015	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATATCATCTTTACCAG	4201
B_8_584_a	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATT	4202
B_8_584_b	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4203
B_8_584_c	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTCCA	4204
B_9_601_a	TACAGTCAGTATCAATTCTG	4017	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTCAGTAT	4205
B_9_601_b	TACAGTCAGTATCAATTCTG	4017	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTCAGTATCA	4206
B_9_601_c	TACAGTCAGTATCAATTCTG	4017	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATAGTCAGTATCAAT	4207
A_3_325_a	CTGGGCGGCAGCATAGTGAG	4004	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCGGCAGC	4166

【表１０３－１１】

B_6_414_b	CCTGACAATCGATAGGTACC	4014	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGACAATCGATA	4197
A_5_507_c	CCCAAGTGATCACACTTGTC	4006	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAAGTGATCACACTT	4174
A_6_510_b	CCACCCAAGTGATCACACTT	4007	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCCCAAGTGATC	4176
A_7_532_b	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4179
B_8_584_b	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4203
A_1077c	GCAGAGCCAGGAACCCCTGT	3975	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGGGTTCCTGGCT	4081
B_1154c	GTCCTTGGCAAGCCCAGGAG	3989	cTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTGGGCTTGCCAA	4123
A_3786c	GCTGGCCCCCCACCGCCCCA	3986	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGGCGGTGGGGGGC	4114
B_3903c	GCGACTCCTGGAAGTGGCCA	4000	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCACTTCCAGGAG	4156
B_3930c	GGACTTCCCAGTGTGCATCG	4001	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTTGCACACTGGGAA	4159
A_7_532_b	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4179
B_8_584_b	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4203
A7_attB_30	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	TCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4208
B8_attB_30	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	TGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4209
A7_attB_20	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4210
B8_attB_20	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	ACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4211
A7_attB_GA_38	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4212
B8_attB_GA_38	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	GGCTTGTCGACGACGGCGGACTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4213
A7_attB_GA_30	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	TCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4214

【表１０３－１２】

B8_attB_GA_30	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	TGTCGACGACGGCGGACTCCGTCGTC AGGATCATGCTCTCATTTTC	4215
A7_attB_GA_20	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	ACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAA GCCAGAGACGCAAA	4216
B8_attB_GA_20	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	ACGACGGCGGACTCCGTCGTCAGGAT CATGCTCTCATTTTC	4217
A7_attP_50	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	GGGTTTGTACCGTACACCACTGAGAC CGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAA GAGACGCAAA	4218
B8_attP_50	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	TGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGT CTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCGC TCTCATTTTC	4219
A7_attP_40	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	TGTACCGTACACCACTGAGACCGCGG TGGTTGACCAGACAAACCAAGAGAC GCAAA	4220
B8_attP_40	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	TGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAG TGGTGTACGGTACAAACCCGCTCTCA TTTTC	4221
A7_attP_30	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	CGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTT GACCAGACAAACCAAGAGACGCAAA	4222
B8_attP_30	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	GGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTG TACGGTACAAACCCGCTCTCATTTTC	4223
A7_attP_GA_50	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	GGGTTTGTACCGTACACCACTGAGTC CGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAA GAGACGCAAA	4224
B8_attP_GA_50	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	TGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGA CTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCGC TCTCATTTTC	4225
A7_attP_GA_40	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	TGTACCGTACACCACTGAGTCCGCGG TGGTTGACCAGACAAACCAAGAGAC GCAAA	4226
B8_attP_GA_40	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	TGTCTGGTCAACCACCGCGGACTCAG TGGTGTACGGTACAAACCCGCTCTCA TTTTC	4227
A7_attP_GA_30	GGGAGAGAC GCAAACACA GC	4008	CGTACACCACTGAGTCCGCGGTGGTT GACCAGACAAACCAAGAGACGCAAA	4228
B8_attP_GA_30	GCAGCTCTC ATTTTCCATA C	4016	GGTCAACCACCGCGGACTCAGTGGTG TACGGTACAAACCCGCTCTCATTTTC	4229
A277_b	GACTGAAAC TTCACAGAA TA	4018	AACTTCACAGAGGCTTGTCGACGACG GCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT	4230
A277_c	GACTGAAAC TTCACAGAA TA	4018	GAAACTTCACAGAGGCTTGTCGACGA CGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT	4231
B358_b	GATTTATGA GATCAACAG CAC	4019	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGT CGTCAGGATCATCTGTTGATCTC	4232
B358_c	GATTTATGA GATCAACAG CAC	4019	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGT CGTCAGGATCATCTGTTGATCTCAT	4233

【表１０３－１３】

A7_attB_20	GGGAGAGACGCAAACACAGC	4008	ACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCAGAGACGCAAA	4210
B8_attB_20	GCAGCTCTCATTTTCCATAC	4016	ACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGCTCTCATTTTC	4211
A277_c	GACTGAAACTTCACAGAATA	4018	GAAACTTCACAGAGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT	4231
B358_c	GATTTATGAGATCAACAGCAC	4019	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTGTTGATCTCAT	4233
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A1_a_attP_fwd.dna	GACACCAAAAACTGCCACAGG	4020	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGTGGCAGTTA	4234
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A1_a_attP_rev.dna	GACACCAAAAACTGCCACAGG	4020	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGTGGCAGTTA	4235
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A1_c_attP_fwd.dna	GACACCAAAAACTGCCACAGG	4020	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTGTGGCAGTTTTA	4236
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A1_c_attP_rev.dna	GACACCAAAAACTGCCACAGG	4020	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTGTGGCAGTTTTA	4237
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A4_b_attP_fwd.dna	GCACTCATTTCCTCCAAGCTC	4021	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCTTGGAGGAAA	4238
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_A4_b_attP_rev.dna	GCACTCATTTCCTCCAAGCTC	4021	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCTTGGAGGAAA	4239
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B2_a_attP_fwd.dna	GTAGGTACAGGACAGGGCAG	4022	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCCTGTCC	4240
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B2_a_attP_rev.dna	GTAGGTACAGGACAGGGCAG	4022	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCCTGTCC	4241
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B3_a_attP_fwd.dna	GAGATAGGTAGGTACAGGACA	4023	TCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCTGTACCT	4242
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B3_a_attP_rev.dna	GAGATAGGTAGGTACAGGACA	4023	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCTGTACCT	4243
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B4_b_attP_fwd.dna	GTGAAAAGATAGGTAGGTAC	4024	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTCCTACCTATCTA	4244
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B4_b_attP_rev.dna	GTGAAAAGATAGGTAGGTAC	4024	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTCCTACCTATCTA	4245
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B7_b_attP_fwd.dna	GTTATGGTTTACTCCATCTA	4025	GTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCTATGGAGTAAACCT	4246
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_B7_b_attP_rev.dna	GTTATGGTTTACTCCATCTA	4025	TACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCTATGGAGTAAACC	4247
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_C2_c_attB_fwd.dna	GTTTTGGTTTACCCTATCTA	4026	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCATAGGGTAAACCA	4248

【表１０３－１４】

pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_C2_c_attB_rev.dna	GTTTTGGTTTACCCTATCTA	4026	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATATAGGGTAAACCA	4249
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_D1_b_attB_fwd.dna	GCTGTGGAACTGCAACACACT	4027	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATGTGTTGCAGT	4250
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_D1_b_attB_rev.dna	GCTGTGGAACTGCAACACACT	4027	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGTGTTGCAGT	4251
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_D2_c_attB_fwd.dna	GTGCCACCTAACAGTGAGCTG	4028	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCTCACTGTTAGGT	4252
pU6-Sp-gRNA-IDS_DF_D2_c_attB_rev.dna	GTGCCACCTAACAGTGAGCTG	4028	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCTCACTGTTAGGT	4253

【１３６４】

哺乳類細胞実験のための全てのベクターは、プラスミドプラスミニプレップキット(Qiagen)またはPureYieldプラスミドミニプレップキット(Promega)またはQIAprepスピンミニプレップキットを用いて精製した。

【１３６５】

一般的な哺乳類細胞培養条件

HEK293T(ATCCのCRL-3216)、U2OS(ATTCのHTB-96)、K562(CCL-243)、およびHeLa(CCL-2)細胞はATCCから購入し、それぞれ、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)プラスGlutaMAX(ThermoFisher Scientific)、マッコイ5A培地(Gibco)、RPMI培地1640プラスGlutaMAX(Gibco)、またはイーグル最小必須培地(EMEM、ATCC)によって培養および継大した。それぞれが10%(v/v)ウシ胎児血清(Gibco、品質検査済み)および1×ペニシリン・ストレプトマイシン(Corning)を足された。全ての細胞型は37℃において5%CO_2でインキュベーション、維持、および培養した。細胞株はそれらのそれぞれのサプライヤーによって品質証明され、マイコプラズマ検査陰性であった。

【１３６６】

HEK293T、HeLa、およびHuh7細胞培養トランスフェクションプロトコールおよびゲノムDNA調製

成長したHEK293T細胞を48ウェルポリD-リジンコーティングプレート(Corning)に播種した。播種の16～24h後に、細胞を、およそ60%コンフルエンシーにおいて、製造者のプロトコールに従う1μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)ならびに:750ngのPE2プラスミド、125ngのpegRNA1、および125ngのpegRNA2(ツインPEトランスフェクション);750ngのPE2プラスミド、250ngのpegRNAプラスミド、および83ngのsgRNAプラスミド(PE3トランスフェクション);または750ngのCas9および125ngのsgRNA1および125ngのsgRNA2(ペアリングされたCas9ヌクレアーゼトランスフェクション)どちらかによってトランスフェクションした。別様に申し立てられない限り、細胞はトランスフェクション後に3日培養し、これの後に、培地を除去し、細胞を1×PBS溶液(Thermo Fisher Scientific)によって洗浄し、ゲノムDNAを直接的に組織培養プレートの各ウェルへの150μLの新しく調製されたリシス緩衝液(10mMのTris-HCl、pH7.5;0.05%SDS;25μg/mLプロテイナーゼK(ThermoFisher Scientific))の追加によって抽出した。ゲノムDNA混合物を37℃で1～2hrに渡ってインキュベーションし、次に30minに渡る80℃の酵素不活性化ステップであった。哺乳類細胞ゲノムDNA増幅に用いられたプライマーは表13に列記されている。

表13．この例に用いられたプライマーの配列

【表１０４－１】

表13. この例に使用されたプライマーの配列

プライマー	配列	配列番号
HEK3_fwd	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATGTGGGCTGCCTAGAAAGG	3811
HEK3_rev	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAGCCAAACTTGTCAACC	3812
HEK3_fwd	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATGTGGGCTGCCTAGAAAGG	3811
HEK3_rev	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCAGCCAAACTTGTCAACC	3812
DMD_UMI_fwd1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNNNNNNtgctggccagtttactaacaat	4254
DMD_UMI_fwd2	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNNNNNNcagaaagaagatcttatcccatcttg	4255
DMD_rev0	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTggctacttttgttatttgcatt	4256
AAVS1_AVA1713	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAGAGCAGGGTCCCGCTTC	4257
AAVS1_AVA1717	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACGGGGCTCAGTCTGAAGAG	4258
AAVS1_AVA1651	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGCCAAGGACTCAAACCCAGA	4259
AAVS1_AVA1652	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCGTGCGTCAGTTTTACCT	4260
AAVS1_AVA1653	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAACTGCTTCTCCTCTTGGGAA	4261
AAVS1_AVA1715	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTTGCCAGAACCTCTAAGGT	4262
AAVS1_AVA1655	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNATCCTCTCTGGCTCCATCGTA	4263
AAVS1_AVA1656	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCACTTCAGGACAGCATGTTT	4264
AAVS1_AVA1707	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCGCCGGGAACTGCCGCTGGC	4265
AAVS1_AVA1710	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGGAGGCCCTCATCTGGCG	4266
CCR5_AVA1678	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGC	4267
CCR5_AVA1679	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCGATTGTCAGGAGGATGATGAA	4268
CCR5_AVA1680	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTCCTTCTTACTGTCCCCTTCTGGGC	4269
CCR5_AVA1681	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAAACACAGCATGGACGAC	4270
CCR5_AVA1682	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNACAATCGATAGGTACCTGGCTGTC	4271
CCR5_AVA1683	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAGCCCCAAGATGACTAT	4272
IDS_AVA1763	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNCTGAAAACCTGAGCTTGGAGG	4273
IDS_AVA1764	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCTACTCCAGCTTAATGGAAGTGG	4274
IDS_AVA1765	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGAGAAGATGTGGAAATGCCTCAC	4275
IDS_AVA1766	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATCAACATGAAGGGTTGTGTTGT	4276
IDS_AVA1769	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNGTTCCCACACATGCGTTCCTC	4277

【表１０４－２】

IDS_AVA1770	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCATGAAGGGTTGTTTTTAATTGA	4278
IDS_UMI_junc1_fwd	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNNNNNNGCCCTGTCCTGTACCTACCT	4279
IDS_junc2_fwd	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNTTCAGTTTGGGGTATGTGCCA	4280
IDS_universal_rev	TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCAAATTTACCCGTGGCAGC	4281

【１３６７】
HeLa細胞では、それらをHEK293T細胞に類似の密度で成長および播種し、細胞の各ウェルを、190ngのPE2_P2A_Blast(ブラストサイジン耐性遺伝子)、31.5ngのpegRNA1、および31.5ngのpegRNA2(ツインPEトランスフェクション)によって、0.75uLのHeLa monster試薬(Mirus)によってトランスフェクションした。次いで、細胞をトランスフェクションの24h後に選択のために10ug/mLによって処置した。ゲノムDNA収集ステップの残りはHEK293T細胞と同一である。Huh7細胞を150ｋ/ウェルで24ウェルポリD-リジンコーティングプレート(Corning)に播種した。播種の16～24h後に、細胞を高いコンフルエンシーにおいて製造者のプロトコールに従う2μLのLipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)および最高で800ngのプラスミドDNAによってトランスフェクションした。ゲノムDNA収集はHEK293Tについて上の通り進んだ。

【１３６８】
<u>ゲノムDNAサンプルのハイスループットDNA配列決定</u>
目当てのゲノム部位をゲノムDNAサンプルから増幅し、次の改変によって先に記載された通りIllumina MiSeqによって配列決定した。手短かには、Illuminaフォワードおよびリバースアダプターを含有する増幅プライマー(表13)を第1ラウンドのPCR(PCR1)に用いて、目当てのゲノム領域を増幅した。25μLのPCR1反応を、0.5μMの各フォワードおよびリバースプライマー、1μLのゲノムDNA抽出物、ならびに12.5μLのPhusion U Green多重PCRマスターミックスによって行なった。PCR反応は次の通り実行した:2minの98℃、次いで30サイクルの[10sの98℃、20sの61℃、および30sの72℃]、次に2minの最後の72℃伸長。固有のIlluminaバーコード化プライマーペアを二次PCR反応(PCR2)の各サンプルに追加した。具体的には、25μLの所与のPCR2反応は、0.5μMの各固有のフォワードおよびリバースIlluminaバーコード化プライマーペア、1μLの未精製のPCR1反応混合物、ならびに12.5μLのPhusion U Green多重PCR2×マスターミックスを含有した。バーコード化PCR2反応を次の通り実行した:2minの98℃、次いで12サイクルの[10sの98℃、20sの61℃、および30sの72℃]、次に2minの最後の72℃伸長。PCR産物を1.5%アガロースゲルによる電気泳動によって分析的に評価した。PCR2産物(共通のアンプリコンによってプールされた)はQIAquickゲル抽出キット(Qiagen)を用いて1.5%アガロースゲルによる電気泳動によって精製され、40μLの水によって溶出した。DNA濃度を蛍光測定定量(Qubit、ThermoFisher Scientific)またはqPCR(KAPAライブラリー定量キットIllumina、KAPA Biosystems)によって測定し、製造者のプロトコールに従ってIllumina MiSeq装置によって配列決定した。

【１３６９】
配列決定読取をMiSeq Reporter(Illumina)を用いてデマルチプレックスした。参照配列に対するアンプリコン配列のアラインメントをCRISPResso2を用いて行なった。全てのプライム編集収量定量のためには、プライム編集効率を:[インデルを含有しない所望の編集を有する読取の#]÷[総読取の#]の%として計算した。点変異編集の定量のためには、CRISPResso2を「discard_indel_reads」オンで標準モードによって走らせた。次いで、点変異の組み入れのためのプライム編集を:[非棄却読取上の規定された点変異の度数]×[非棄却読取の#]÷[総読取]として陽的に計算した。編集の定量のためには、CRISPResso2を、HDRモードで、予想されるアレル(eフラグ)として所望のアレルを用いて、「discard_indel_reads」オンで走らせた。編集収量は:[非棄却HDRアラインメント読取の#]÷[総読取]として計算した。インデル収量は:[インデル含有棄却読取の#]÷[総読取]として計算した。固有分子識別子(UMI)を適用して、欠失効率を定量し、この3ステップPCRプロトコールにおけるPCRバイアスを評価した。手短かには、線形増幅の第1ステップにおいて、1uLのゲノムDNA抽出物を、15bpまたは16bpの固有分子識別子を含有する0.1uMの単一のフォワードUMIプライマーと12.5uLのPhusion U Green多重PCRマスターミックスとによって25uL反応で線形増幅した。次いで、PCR産物を1.6×AmPureビーズ(Beckman Coulter)によって精製し、20uLのQIAGEN溶出緩衝液によって溶出した。第2のステップにおいて、次いで、1または2uLの線形増幅さ

れたPCR溶出液を、30サイクルに渡って0.5uMの各フォワードおよびリバースプライマー、Phusion U Green多重PCRミックスによって25uL反応で増幅した。このケースでは、フォワードプライマーはP5のIlluminaアダプター配列にアニールし、これはUMIプライマーの5'にかつUMIの上流に位置付けられる。PCR産物を1×ampureビーズによって精製し、25uLの溶出緩衝液によって溶出した。第3のステップにおいて、1uL溶出液を、固有のIlluminaバーコードを追加するために上で言及された通り12サイクルに渡って増幅した。DMD遺伝子座における大きい欠失を評価するためには、上段のバンド(編集されない大きいアンプリコン)および下段のバンド(欠失を有する編集されたアンプリコン)を別個に1.5%アガロースから切除し、最終的なライブラリー(60pMの上段のバンド対20pMの下段のバンド)を2つの別個のMiseqキットにローディングして、短いもの(～300bp)と比較して大きいアンプリコン(～1kb)の弱いクラスタリングを回避した。

【１３７０】

生の配列決定読取をAmpUMIを用いてUMIデデュプリケーションした。ペアエンドの読取では、SeqKitを用いて、R2の逆相補とR1をコンカテネーションした(オーバーラップなしで重ね合わせた)。コンカテネーションされたR1＋R2をR1の5'端のUMIを用いてUMIデデュプリケーションした。UMIデデュプリケーションされたR1またはコンカテネーションされたR1＋R2を、CRISPResso2を用いて分析した。コンカテネーションされたR1＋R2を分析するためには、適当なコンカテネーションされた参照アンプリコン配列を提供して、コンカテネーションを原因とする配列決定アラインメントアーティファクトを最小化した。

【１３７１】

U2OSおよびK562のヌクレオフェクション

ヌクレオフェクションはK562およびU2OS細胞を用いる全ての実験において行なった。200，000細胞をヌクレオフェクション当たり用いた。カウントされた細胞をスピンダウンし、PBSによって洗浄し、次いで、Lonza SE Cell Line 4D-Nucleofectorキットの推奨に従ってヌクレオフェクション溶液に再懸濁した。デバイス上の細胞ヌクレオフェクション後に、細胞がキュベット内で室温において10分に渡ってインキュベーションすることを許した。キュベットの内容を、予温した培地を満たした48ウェルプレートに移した。上で言及されている通り、ゲノムDNAを抽出し、Illumina Miseq調製のために調製した。

【１３７２】

ワンポットツインPEおよびBxbIによって媒介されるカーゴノックインおよび大きい逆位:

ワンポットによって媒介される大きい逆位実験のために、逐次的なプラスミドトランスフェクションおよびワンポットmRNAヌクレオフェクションを行なった。逐次的なプラスミドトランスフェクション実験では、上で言及されている通り、HEK293T細胞を750ngのPE2、62.5ngの各pegRNA(合計4つ)によってLipofectamine 2000を用いてトランスフェクションした。3日後に、細胞をトリプシン処理し、24ウェルプレートにプレーティングし、約7日に渡って継代した。次いで、20K細胞を再び播種し、500ngのBxBIプラスミドによってトランスフェクションした。上で言及されている通り、ゲノムDNAを抽出し、Illumina Miseq調製のために調製した。ワンポットmRNAヌクレオフェクション実験では、200，000細胞を1ugのPE2のmRNA、各30pmolの合成pegRNA(合計4つのpegRNA)、および750ngのBxBIのmRNAによってヌクレオフェクションした。合成pegRNAはIDTに発注し、mRNA転写物は公開されたプロトコールに従ってインビトロ転写した。Lonza緩衝液および細胞の20uL混合物をプログラムCM-130によってエレクトロポレーションし、80uLの温めた培地によって5分に渡ってリカバリーした。次いで、キュベットからの25uLサンプルを48ウェルプレートの各ウェルに追加し、37℃で72時間に渡ってインキュベーションした。

本開示において言及される他の参考文献

次の参考文献は各々、それらの全体が参照によって本願に組み込まれる。

【表１０５－１】

1. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).

2. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).

3. Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* **168**, 20–36 (2017).

4. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).

5. Nishida, K. *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**, aaf8729 (2016).

6. Gaudelli, N. M. *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471 (2017).

7. ClinVar, July 2019.

【表１０５－２】

8. Dunbar, C. E. *et al.* Gene therapy comes of age. *Science* **359**, eaan4672 (2018).

9. Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat. Med.* **21**, 121–131 (2015).

10. Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**, 1911 (2018).

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

12. Kleinstiver, B. P. *et al.* High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* **529**, 490–495 (2016).

13. Hu, J. H. *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **556**, 57–63 (2018).

14. Nishimasu, H. *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* **361**, 1259–1262 (2018).

15. Jasin, M. & Rothstein, R. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012740 (2013).

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

17. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* **36**, 765–771 (2018).

18. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Med.* **24**, 927–930 (2018).

19. Ihry, R. J. *et al.* p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **24**, 939–946 (2018).

20. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L. & Corn, J. E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* **34**, 339–344 (2016).

21. Srivastava, M. *et al.* An Inhibitor of Nonhomologous End-Joining Abrogates Double-Strand Break Repair and Impedes Cancer Progression. *Cell* **151**, 1474–1487 (2012).

【表１０５－３】

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

23. Maruyama, T. *et al.* Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat. Biotechnol.* **33**, 538–542 (2015).

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

25. Li, X. *et al.* Base editing with a Cpf1–cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **36**, 324–327 (2018).

26. Gehrke, J. M. *et al.* An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nat. Biotechnol.* (2018). doi:10.1038/nbt.4199

27. Rees, H. A. & Liu, D. R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.* 1 (2018). doi:10.1038/s41576-018-0059-1.

28. Ostertag, E. M. & Kazazian Jr, H. H. Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501–538 (2001).

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

30. 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).

31. 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).

32. Jinek, M. *et al.* Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science* **343**, 1247997 (2014).

33. Jiang, F. *et al.* Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science* aad8282 (2016). doi:10.1126/science.aad8282

34. Qi, L. S. *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* **152**, 1173–1183 (2013).

35. Tang, W., Hu, J. H. & Liu, D. R. Aptazyme-embedded guide RNAs enable ligand-

【表１０５－４】

responsive genome editing and transcriptional activation. *Nat. Commun.* **8**, 15939 (2017).

36. Shechner, D. M., Hacisuleyman, E., Younger, S. T. & Rinn, J. L. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. *Nat. Methods* **12**, 664–670 (2015).

37. Anders, C. & Jinek, M. Chapter One - *In vitro* Enzymology of Cas9. in *Methods in Enzymology* (eds. Doudna, J. A. & Sontheimer, E. J.) **546**, 1–20 (Academic Press, 2014).

38. Briner, A. E. *et al.* Guide RNA Functional Modules Direct Cas9 Activity and Orthogonality. *Mol. Cell* **56**, 333–339 (2014).

39. Nowak, C. M., Lawson, S., Zerez, M. & Bleris, L. Guide RNA engineering for versatile Cas9 functionality. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9555–9564 (2016).

40. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. & Doudna, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**, 62–67 (2014).

41. 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).

42. 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. *Mol. Cell* **68**, 926- 939.e4 (2017).

43. Zhao, C. & Pyle, A. M. Crystal structures of a group II intron maturase reveal a missing link in spliceosome evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 558–565 (2016).

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

45. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).

46. Liu, Y., Kao, H.-I. & Bambara, R. A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 589–615 (2004).

47. Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).

48. Kelman, Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**, 629–640 (1997).

【表１０５－５】

49. Choe, K. N. & Moldovan, G.-L. Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork. *Mol. Cell* **65**, 380–392 (2017).

50. Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M. R. & Burgers, P. M. Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* **270**, 22109–22112 (1995).

51. Tom, S., Henricksen, L. A. & Bambara, R. A. Mechanism whereby proliferating cell nuclear antigen stimulates flap endonuclease 1. *J. Biol. Chem.* **275**, 10498–10505 (2000).

52. Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S. & Vale, R. D. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* **159**, 635–646 (2014).

53. Bertrand, E. *et al.* Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**, 437–445 (1998).

54. Dahlman, J. E. *et al.* Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1159–1161 (2015).

55. Tsai, S. Q. *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 187–197 (2015).

56. Tsai, S. Q. *et al.* CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nat. Methods* **14**, 607–614 (2017).

57. Schek N, Cooke C, Alwine JC. Molecular and Cellular Biology. (1992).

58. Gil A, Proudfoot NJ. Cell. (1987).

59. Zhao, B.S., Roundtree, I.A., He, C. Nat Rev Mol Cell Biol. (2017).

60. Rubio, M.A.T., Hopper, A.K. Wiley Interdiscip Rev RNA (2011).

61. Shechner, D.M., Hacisuleyman E., Younger, S.T., Rinn, J.L. Nat Methods. (2015).

62. Paige, J.S., Wu, K.Y., Jaffrey, S.R. Science (2011).

63. Ray D., … Hughes TR. Nature (2013).

64. Chadalavada, D. M., Cerrone-Szakal, A. L., Bevilacqua, P.C. RNA (2007).

【表１０５－６】

65. Forster AC, Symons RH. Cell. (1987).

66. Weinberg Z, Kim PB, Chen TH, Li S, Harris KA, Lünse CE, Breaker RR. Nat. Chem. Biol. (2015).

67. Feldstein PA, Buzayan JM, Bruening G. Gene (1989).

68. Saville BJ, Collins RA. Cell. (1990).

69. Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA, Breaker RR. Nature (2004).

70. Roth A, Weinberg Z, Chen AG, Kim PG, Ames TD, Breaker RR. Nat Chem Biol. (2013).

71. Choudhury R, Tsai YS, Dominguez D, Wang Y, Wang Z. Nat Commun. (2012).

72. MacRae IJ, Doudna JA. Curr Opin Struct Biol. (2007).

73. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ Nature (2001).

74. Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. Gene (2000).

75. Cadwell RC and Joyce GF. PCR Methods Appl. (1992).

76. McInerney P, Adams P, and Hadi MZ. Mol Biol Int. (2014).

77. Esvelt KM, Carlson JC, and Liu DR. Nature. (2011).

78. Naorem SS, Hin J, Wang S, Lee WR, Heng X, Miller JF, Guo H. Proc Natl Acad Sci USA (2017).

79. Martinez MA, Vartanian JP, Wain-Hobson S. Proc Natl Acad Sci USA (1994).

80. Meyer AJ, Ellefson JW, Ellington AD. Curr Protoc Mol Biol. (2014).

81. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. Nature. (2009).

82. Nyerges Á et al. Proc Natl Acad Sci USA. (2016).

83. Mascola JR, Haynes BF. Immunol Rev. (2013).

84. X. Wen, K. Wen, D. Cao, G. Li, R. W. Jones, J. Li, S. Szu, Y. Hoshino, L. Yuan, Inclusion of a universal tetanus toxoid CD4(+) T cell epitope P2 significantly enhanced the

【表１０５－７】

immunogenicity of recombinant rotavirus ΔVP8* subunit parenteral vaccines. Vaccine 32, 4420-4427 (2014).

85. G. Ada, D. Isaacs, Carbohydrate-protein conjugate vaccines. Clin Microbiol Infect 9, 79-85 (2003).

86. E. Malito, B. Bursulaya, C. Chen, P. L. Surdo, M. Picchianti, E. Balducci, M. Biancucci, A. Brock, F. Berti, M. J. Bottomley, M. Nissum, P. Costantino, R. Rappuoli, G. Spraggon, Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 5229 (2012).

87. J. de Wit, M. E. Emmelot, M. C. M. Poelen, J. Lanfermeijer, W. G. H. Han, C. van Els, P. Kaaijk, The Human CD4(+) T Cell Response against Mumps Virus Targets a Broadly Recognized Nucleoprotein Epitope. J Virol 93, (2019).

88. M. May, C. A. Rieder, R. J. Rowe, Emergent lineages of mumps virus suggest the need for a polyvalent vaccine. Int J Infect Dis 66, 1-4 (2018).

89. M. Ramamurthy, P. Rajendiran, N. Saravanan, S. Sankar, S. Gopalan, B. Nandagopal, Identification of immunogenic B-cell epitope peptides of rubella virus E1 glycoprotein towards development of highly specific immunoassays and/or vaccine. Conference Abstract, (2019).

90. U. S. F. Tambunan, F. R. P. Sipahutar, A. A. Parikesit, D. Kerami, Vaccine Design for H5N1 Based on B- and T-cell Epitope Predictions. Bioinform Biol Insights 10, 27-35 (2016).

91. Asante, EA. et. al. "A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease". Nature. (2015).

92. Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Three-part inventions: intracellular signaling and induced proximity. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 418–22 (1996).

93. Liu, J. *et al.* Calcineurin Is a Common Target of A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **66**, 807–815 (1991).

94. Keith, C. T. *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* **369**, 756–758 (2003).

95. Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. S. & Crabtree, G. R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* **262**, 1019–24 (1993).

96. Pruschy, M. N. *et al.* Mechanistic studies of a signaling pathway activated by the organic dimerizer FK1012. *Chem. Biol.* **1**, 163–172 (1994).

【表１０５－８】

97. Spencer, D. M. *et al.* Functional analysis of Fas signaling *in vivo* using synthetic inducers of dimerization. *Curr. Biol.* **6**, 839–847 (1996).
98. Belshaw, P. J., Spencer, D. M., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Controlling programmed cell death with a cyclophilin-cyclosporin-based chemical inducer of dimerization. *Chem. Biol.* **3**, 731–738 (1996).
99. Yang, J. X., Symes, K., Mercola, M. & Schreiber, S. L. Small-molecule control of insulin and PDGF receptor signaling and the role of membrane attachment. *Curr. Biol.* **8**, 11–18 (1998).
100. Belshaw, P. J., Ho, S. N., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 4604–4607 (2002).
101. Stockwell, B. R. & Schreiber, S. L. Probing the role of homomeric and heteromeric receptor interactions in TGF-β signaling using small molecule dimerizers. *Curr. Biol.* **8**, 761–773 (2004).
102. Spencer, D. M., Graef, I., Austin, D. J., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. A general strategy for producing conditional alleles of Src-like tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9805–9809 (2006).
103. Holsinger, L. J., Spencer, D. M., Austin, D. J., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. Signal transduction in T lymphocytes using a conditional allele of Sos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 9810–9814 (2006).
104. Myers, M. G. Insulin Signal Transduction and the IRS Proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 615–658 (1996).
105. Watowich, S. S. The erythropoietin receptor: Molecular structure and hematopoietic signaling pathways. *J. Investig. Med.* **59**, 1067–1072 (2011).
106. Blau, C. A., Peterson, K. R., Drachman, J. G. & Spencer, D. M. A proliferation switch for genetically modified cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 3076–3081 (2002).
107. Clackson, T. *et al.* Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10437–10442 (1998).
108. Diver, S. T. & Schreiber, S. L. Single-step synthesis of cell-permeable protein dimerizers that activate signal transduction and gene expression. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 5106–5109 (1997).
109. Guo, Z. F., Zhang, R. & Liang, F. Sen. Facile functionalization of FK506 for biological studies by the thiol-ene 'click' reaction. *RSC Adv.* **4**, 11400–11403 (2014).
110. Robinson, D. R., Wu, Y.-M. & Lin, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548–5557 (2000).
111. Landrum, M. J. et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. Nucleic Acids Res. 44, D862–D868 (2016).

【表１０５－９】

112. Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science 337, 816–821 (2012).
113. Cong, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science 339, 819–823 (2013).
114. Mali, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Science 339, 823– 826 (2013).
115. Yang, H. et al. One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. Cell 154, 1370–1379 (2013).
116. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res. 24, 1012–1019 (2014).
117. Orlando, S. J. et al. Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. Nucleic Acids Res. 38, e152–e152 (2010).
118. Tsai, S. Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat. Biotechnol. 33, 187–197 (2015).
119. Suzuki, K. et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology- independent targeted integration. Nature 540, 144–149 (2016).
120. Kosicki, M., Tomberg, K. & Bradley, A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nat. Biotechnol. 36, 765–771 (2018).
121. Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. Nat. Med. 24, 927–930 (2018).
122. Ihry, R. J. et al. p53 inhibits CRISPR–Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. Nat. Med. 24, 939–946 (2018).
123. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the end game: DNA double- strand break repair pathway choice. Mol. Cell 47, 497–510 (2012).
124. Cox, D. B. T., Platt, R. J. & Zhang, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nat. Med. 21, 121–131 (2015).
125. Paquet, D. et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. Nature 533, 125–129 (2016).
126. Chu, V. T. et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 33, 543–548 (2015).
127. Maruyama, T. et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR- Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nat. Biotechnol. 33, 538–542 (2015).
128. Rees, H. A., Yeh, W.-H. & Liu, D. R. Development of hRad51–Cas9 nickase fusions that mediate HDR without double-stranded breaks. Nat. Commun. 10, 1–12 (2019).

【表１０５－１０】

129. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature 533, 420– 424 (2016).
130. Gaudelli, N. M. et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature 551, 464–471 (2017).
131. Gao, X. et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. Nature 553, 217–221 (2018).
132. Ingram, V. M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. Nature 178, 792–794 (1956).
133. Myerowitz, R. & Costigan, F. C. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. J. Biol. Chem. 263, 18587–18589 (1988).
134. Zielenski, J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. Respiration 67, 117–133 (2000).
135. Mead, S. et al. A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure. N. Engl. J. Med. 361, 2056–2065 (2009).
136. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science 322, 1843–1845 (2008).
137. Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315, 1709–1712 (2007).
138. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. Annu. Rev. Biophys. 46, 505–529 (2017).
139. Hille, F. et al. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. Cell 172, 1239–1259 (2018).
140. 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).
141. Liu, Y., Kao, H.-I. & Bambara, R. A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. Annu. Rev. Biochem. 73, 589–615 (2004).
142. Rees, H. A. & Liu, D. R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. Nat. Rev. Genet. 19, 770 (2018).
143. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L. & Corn, J. E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. Nat. Biotechnol. 34, 339–344 (2016).
144. Qi, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. Cell 152, 1173–1183 (2013).

【表１０５－１１】

145. Shechner, D. M., Hacisuleyman, E., Younger, S. T. & Rinn, J. L. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. Nat. Methods 12, 664–670 (2015).
146. Tang, W., Hu, J. H. & Liu, D. R. Aptazyme-embedded guide RNAs enable ligand- responsive genome editing and transcriptional activation. Nat. Commun. 8, 15939 (2017).
147. Jinek, M. et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. Science 343, 1247997 (2014).
148. Nishimasu, H. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. Cell 156, 935–949 (2014).
149. Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S. & Doudna, J. A. A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. Science 348, 1477–1481 (2015).
150. 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).
151. 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).
152. 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).
153. 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).
154. Shen, M. W. et al. Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. Nature 563, 646–651 (2018).
155. Thuronyi, B. W. et al. Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. Nat. Biotechnol. (2019). doi:10.1038/s41587-019- 0193-0
156. Kim, Y. B. et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. Nat. Biotechnol. 35, 371–376 (2017).
157. Koblan, L. W. et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat. Biotechnol. (2018). doi:10.1038/nbt.4172
158. Komor, A. C. et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. Sci. Adv. 3, eaao4774 (2017).
159. Kleinstiver, B. P. et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature 529, 490–495 (2016).
160. Zuo, E. et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. Science 364, 289–292 (2019).

【表１０５－１２】

161. Jin, S. et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. Science 364, 292–295 (2019).
162. Kim, D., Kim, D., Lee, G., Cho, S.-I. & Kim, J.-S. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors. Nat. Biotechnol. 37, 430–435 (2019).
163. Grünewald, J. et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR- guided DNA base editors. Nature 569, 433–437 (2019).
164. Zhou, C. et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. Nature 571, 275–278 (2019).
165. Rees, H. A., Wilson, C., Doman, J. L. & Liu, D. R. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors. Sci. Adv. 5, eaax5717 (2019).
166. Ostertag, E. M. & Kazazian Jr, H. H. Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. Annu. Rev. Genet. 35, 501–538 (2001).
167. Griffiths, D. J. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. Genome Biol. 2, REVIEWS1017 (2001).
168. Berkhout, B., Jebbink, M. & Zsíros, J. Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus. J. Virol. 73, 2365–2375 (1999).
169. 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. J. Virol. 74, 10349–10358 (2000).
170. Dever, D. P. et al. CRISPR/Cas9 Beta-globin Gene Targeting in Human Hematopoietic Stem Cells. Nature 539, 384–389 (2016).
171. Park, S. H. et al. Highly efficient editing of the β-globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gkz475
172. Collinge, J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. Annu. Rev. Neurosci. 24, 519–550 (2001).
173. Asante, E. A. et al. A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. Nature 522, 478–481 (2015).
174. Anzalone, A. V., Lin, A. J., Zairis, S., Rabadan, R. & Cornish, V. W. Reprogramming eukaryotic translation with ligand-responsive synthetic RNA switches. Nat. Methods 13, 453–458 (2016).
175. Badran, A. H. et al. Continuous evolution of Bacillus thuringiensis toxins overcomes insect resistance. Nature 533, 58–63 (2016).
176. Anders, C. & Jinek, M. Chapter One - In Vitro Enzymology of Cas9. in Methods in Enzymology (eds. Doudna, J. A. & Sontheimer, E. J.) 546, 1–20 (Academic Press, 2014).

【表１０５－１３】

177. Pirakitikulr, N., Ostrov, N., Peralta-Yahya, P. & Cornish, V. W. PCRless library mutagenesis via oligonucleotide recombination in yeast. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 19, 2336–2346 (2010).
178. Clement, K. et al. CRISPResso2 provides accurate and rapid genome editing sequence analysis. Nat. Biotechnol. 37, 224–226 (2019).
179. Tsai, S. Q. et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat. Biotechnol. 33, 187–197 (2015).
180. Kleinstiver, B. P. et al. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off- target effects. Nature 529, 490–495 (2016).
181. Koblan, L. W. et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat. Biotechnol. (2018). doi:10.1038/nbt.4172
182. 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).
183. Schechner, DM, Hacisuleyman E., Younger ST, Rinn JL. Nat Methods 664-70 (2015).
184. Brown JA, et al. Nat Struct Mol Biol 633-40 (2014).
185. Conrad NA and Steitz JA. EMBO J 1831-41 (2005).
186. Bartlett JS, et al. Proc Natl Acad Sci USA 8852-7 (1996).
187. Mitton-Fry RM, DeGregorio SJ, Wang J, Steitz TA, Steitz JA. Science 1244-7 (2010).
188. Forster AC, Symons RH. Cell. 1987.
189. Weinberg Z, Kim PB, Chen TH, Li S, Harris KA, Lünse CE, Breaker RR. Nat. Chem. Biol. 2015.
190. Feldstein PA, Buzayan JM, Bruening G. Gene 1989.
191. Saville BJ, Collins RA. Cell. 1990.
192. Roth A, Weinberg Z, Chen AG, Kim PG, Ames TD, Breaker RR. Nat Chem Biol. 2013.
193. Borchardt EK, et al. RNA 1921-30 (2015).
194. Zhang Y, et al. Mol Cell 792-806 (2013).
195. Dang Y, et al. Genome Biol 280 (2015).
196. Schaefer M, Kapoor U, and Jantsch MF. Open Biol 170077 (2017).
197. Nahar S, et al. Chem Comm 2377-80 (2018).
198. Gao Y and Zhao Y. J Integr Plant Biol 343-9 (2014).
199. Dubois N, Marquet R, Paillart J, Bernacchi S. Front Microbiol 527 (2018).
200. Costa M and Michel F. EMBO J 1276-85 (1995).
201. Hu JH, et al. Nature 57-63 (2018).
202. Furukawa K, Gu H, Breaker RR. Methods Mol Biol 209-20 (2014).

【表１０５－１４】

203. Zettler, J., Schütz, V. & Mootz, H. D. The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction. FEBS Lett. 583, 909–914 (2009).
204. Kügler, S., Kilic, E. & Bähr, M. Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. 10, 337–347 (2003).
205. de Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D. & Brown, J. D. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. J. Biol. Chem. 278, 11441–11448 (2003).
206. Levy, J. M. & Nicoll, R. A. Membrane-associated guanylate kinase dynamics reveal regional and developmental specificity of synapse stability. J. Physiol. 595, 1699–1709 (2017).
207. Li, B. & Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 12, 323 (2011).
208. Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res. 43, e47–e47 (2015).

【１３７３】
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」を包含するクレームまたは記載は、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、所定の生成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、所定の生成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、所定の生成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。
【１３７４】
しかも、本発明は、列挙されたクレームの1以上からの1以上の限定、要素、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、組み合わせ、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修飾され得る。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、特定の要素および/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、かかる要素および/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、本明細書中、in haec verbaで具体的に表明されていない。用語「含むこと(comprising)」および「含有すること(containing)」が、オープンであることを意図し、追加の要素またはステップの包含を容認することにもまた留意する。範囲が与えられるとき、エンドポイントも包含される。しかも、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。

【１３７５】

本出願は、種々の発行済み特許、公開特許出願、雑誌記事、および他の公刊物を参照し、これらのすべては参照によって本明細書に組み込まれる。組み込まれる参照のいずれかと本明細書との間に矛盾がある場合、本明細書がコントロールする(control)ものとする。加えて、先行技術に属する本発明のいずれか特定の態様は、クレームのいずれかの1以上からはっきりと除外され得る。かかる態様は当業者に知られていると思われるので、それらは、除外が本明細書においてはっきりと表明されていない場合であっても、除外され得る。本発明のいずれか特定の態様は、先行技術の存在に関するか否かにかかわらず、いずれかのクレームから、いずれかの理由で除外され得る。

【１３７６】

当業者は、本明細書に記載の具体的な態様の多くの均等物を認識するか、またはせいぜいルーチンな実験法を使用して確かめる能力があるであろう。本明細書に記載の本態様の範囲は、上の記載に限定されることを意図せず、むしろ添付のクレームに表明されているとおりである。当業者は、以下のクレームにおいて定義されるとおり、本発明の精神または範囲から逸脱せずに、この記載への種々の変化および修飾がなされてもよいことを解するであろう。

【図面】

【図１Ａ－Ｂ】

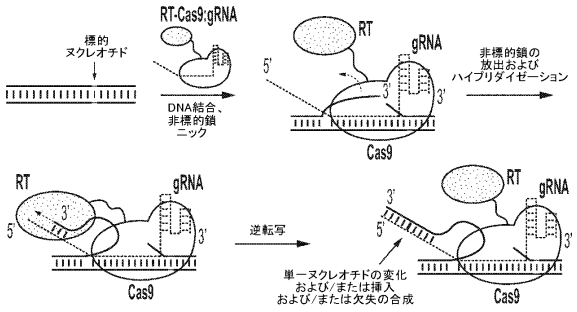


図1A

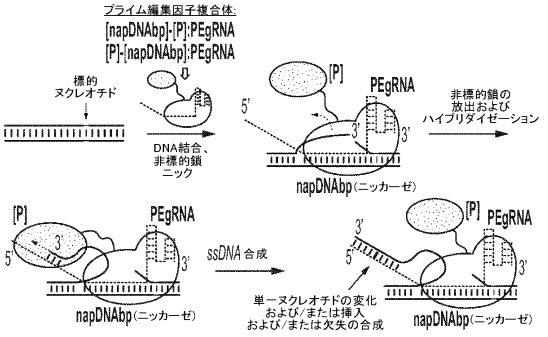


図1B

【図１Ｃ－Ｄ】

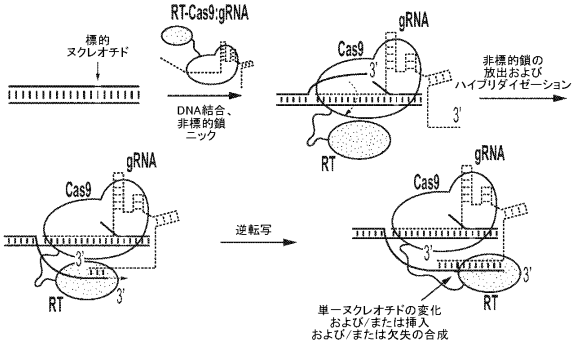


図 1C

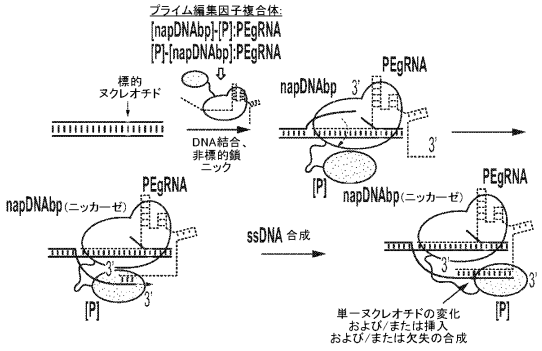


図 1D

【図１Ｅ－Ｆ】

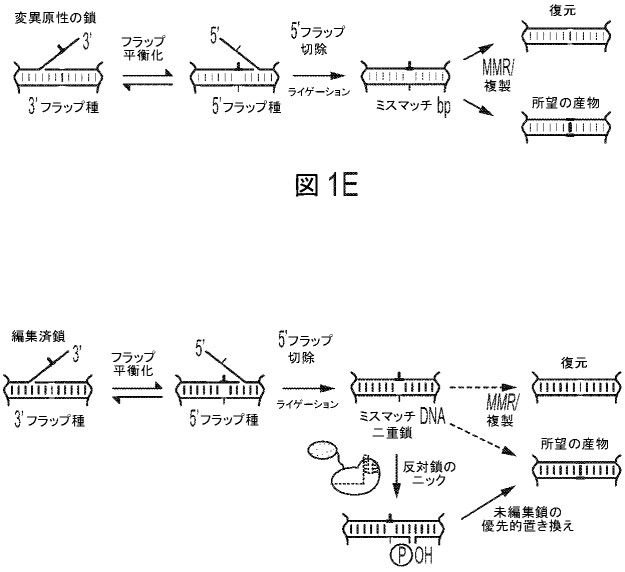


図1E

図1F

【図１Ｇ】

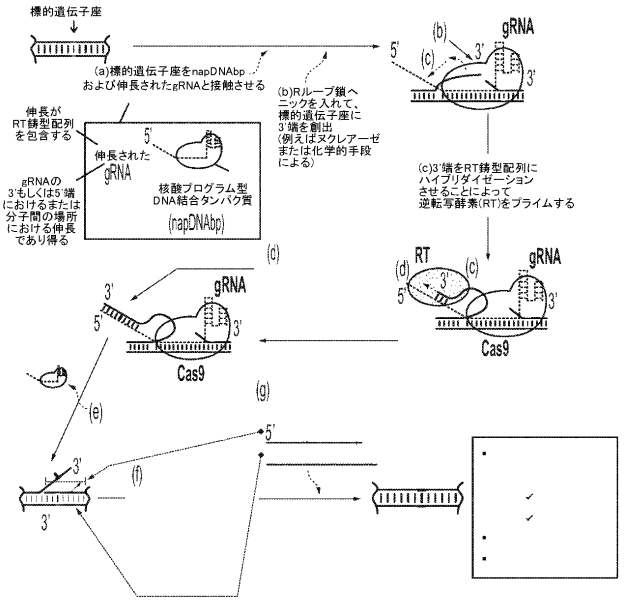


図1G

【図１Ｈ】

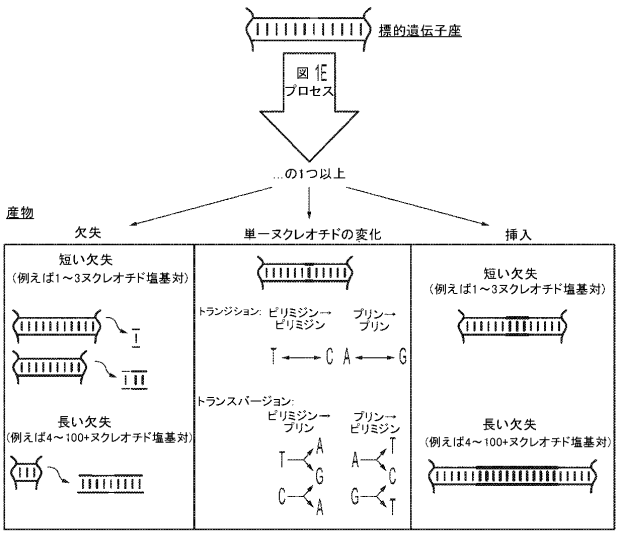


図1H

【図１ｉ】

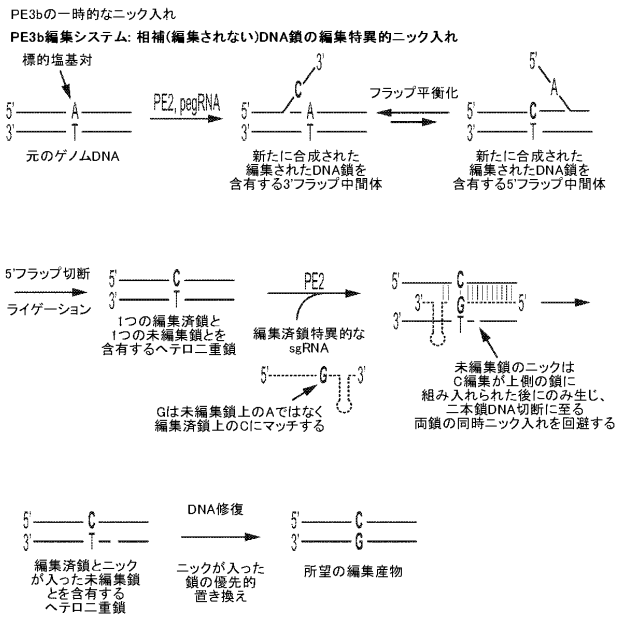


図 1I

【図１Ｊ】

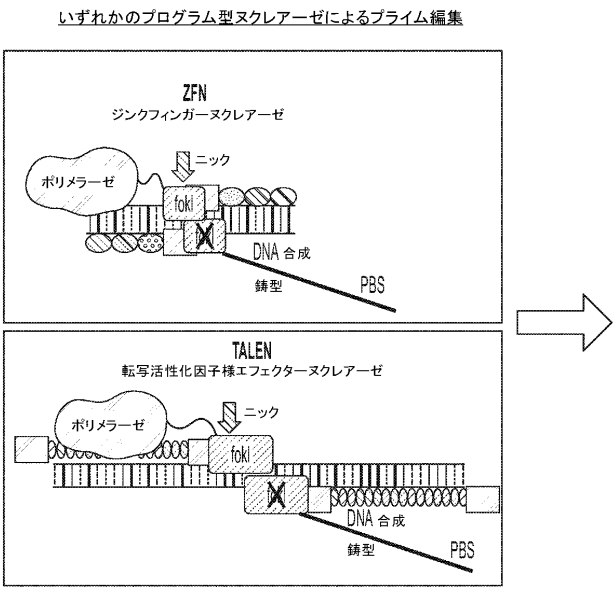


図 1J

【図１Ｋ】

所望の編集を含有し、かつDNA合成鋳型に対するポリメラーゼによってコードされる置き換え鎖のポリメラーゼ依存的合成。メカニズムはプライム編集と類似に作動することが想定される。全体としての反応を容易化するために、追加の因子またはエフェクターがトランスでまたは融合体として追加され得る(例えば、(a)3'端を有するカットされる鎖をプライマーとして利用可能にするために、カット部位においてDNAをほどくためのヘリカーゼ、(b)合成された鎖による内生鎖の置き換えの方に反応を推進するために、カットされる鎖上の内生鎖を除去することを助けるためのFEN1、または(c)非編集鎖の好まれる細胞性修復による合成修復の取り入れを推進することを助け得る、反対鎖上に第2の部位のニックを創出するためのnCas9:gRNA複合体)。

図 1K

【図１Ｌ】

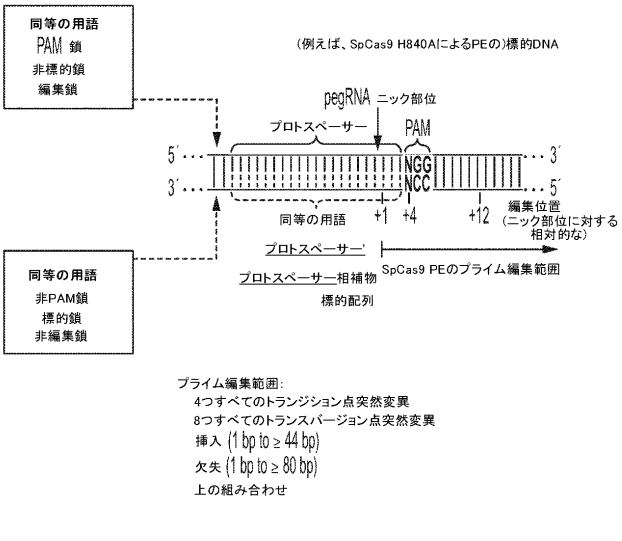


図 1L

【図１Ｍ】

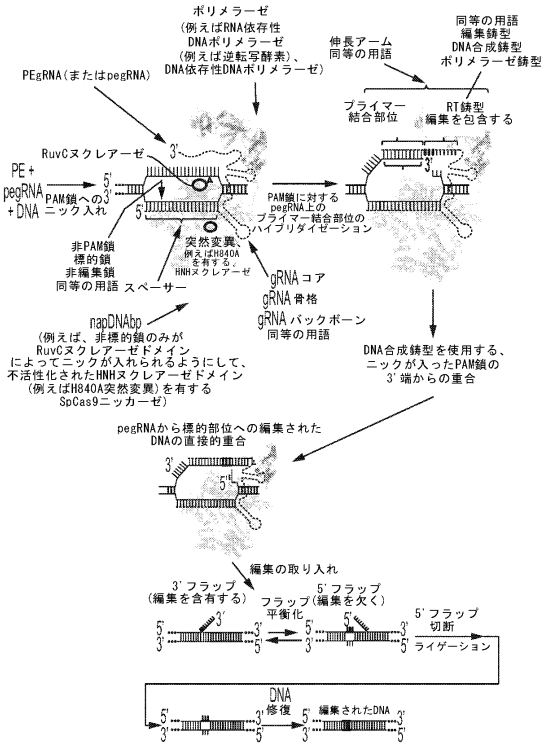


図 1M

【図２】

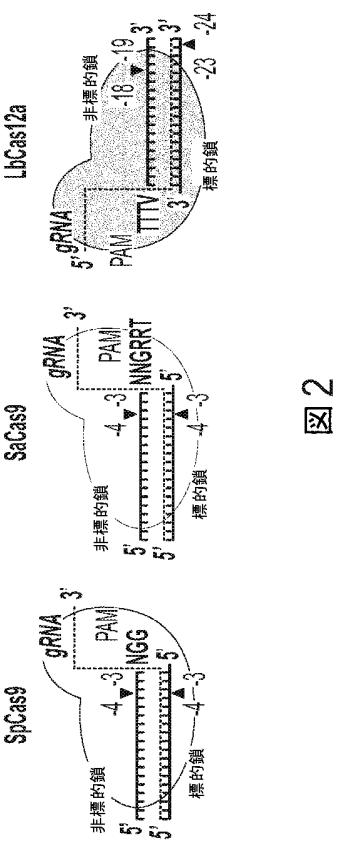


図２

【図３Ａ】

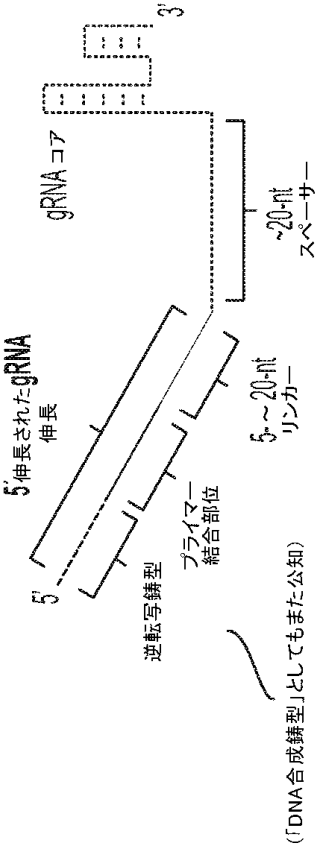


図３Ａ

【図３Ｂ－Ｃ】

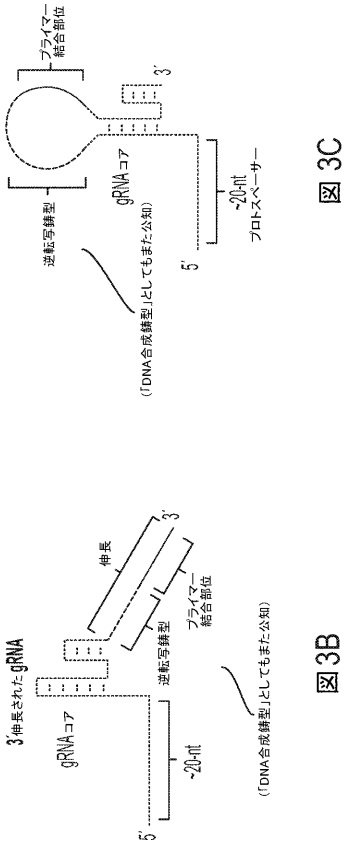


図３Ｂ

図３Ｃ

【図３Ｄ】

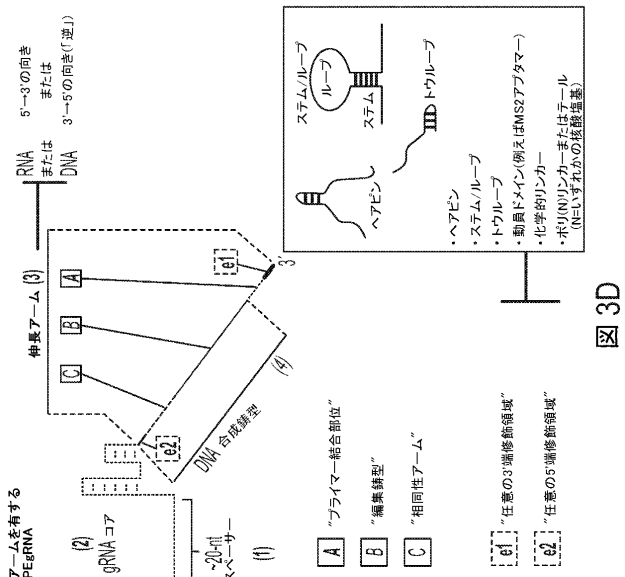


図３Ｄ

【図３Ｅ】

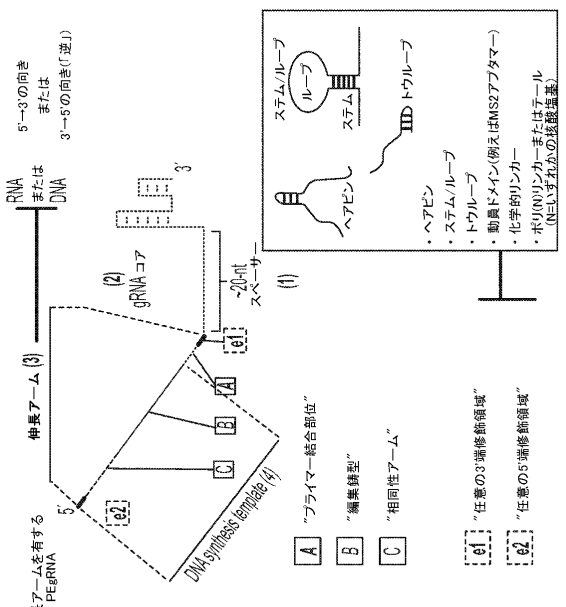


図 3E

【図３Ｆ】

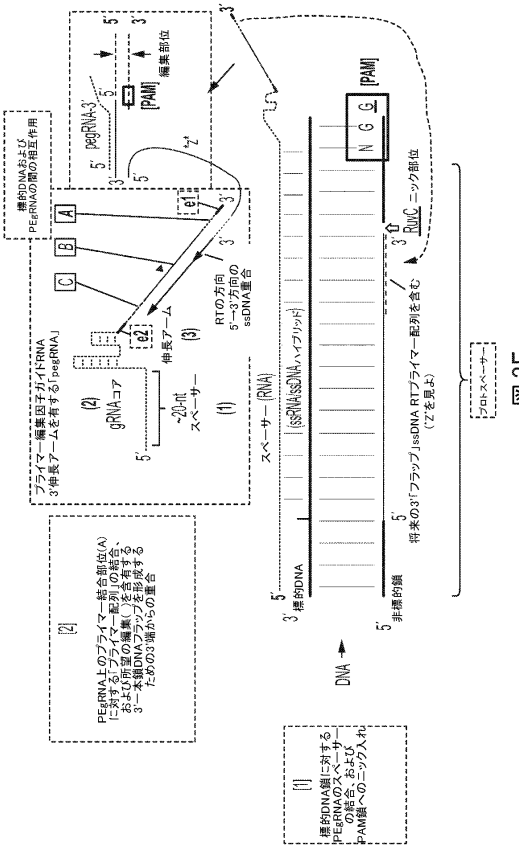


図 3F

【図３Ｇ－Ｈ】

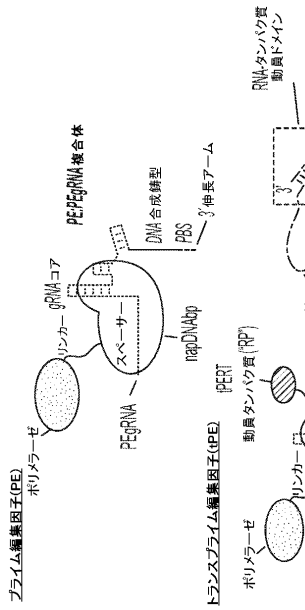


図 3G

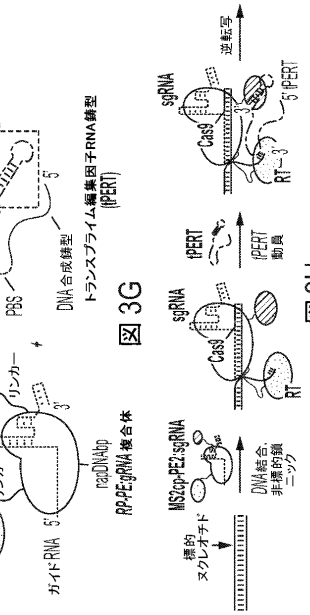


図 3H

【図４Ａ－Ｃ】

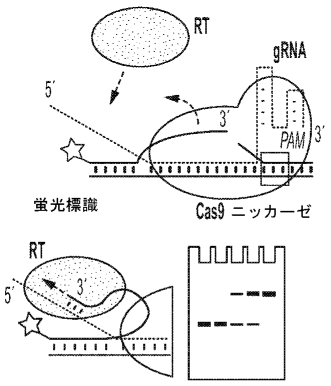


図 4A

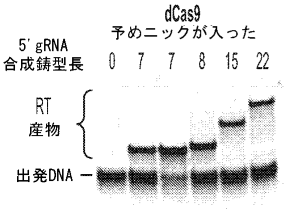


図 4B

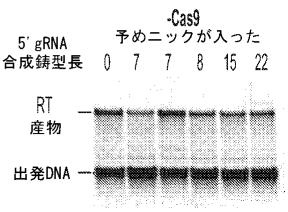


図 4C

【図４Ｄ－Ｅ】

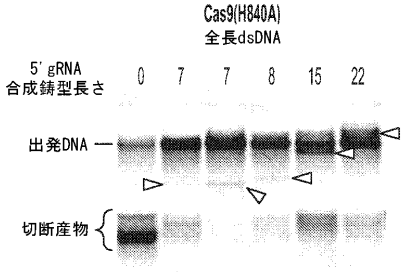


図 4D

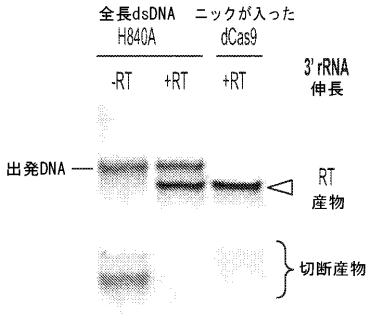


図 4E

【図５】

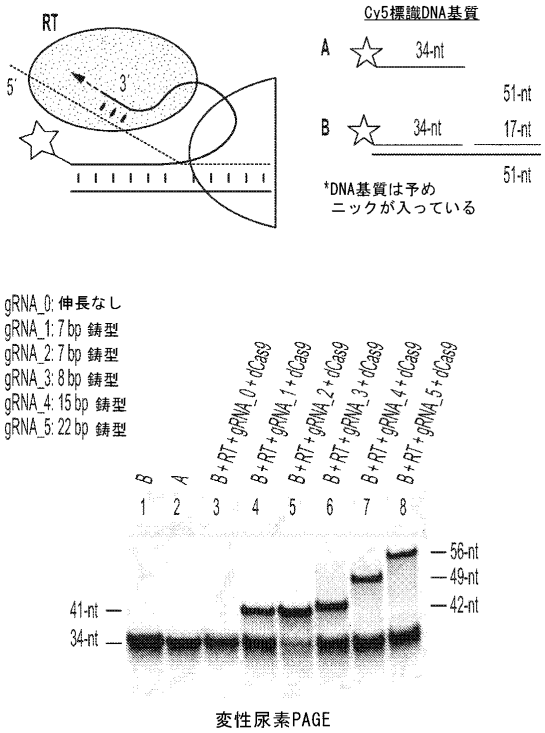


図 5

【図６】

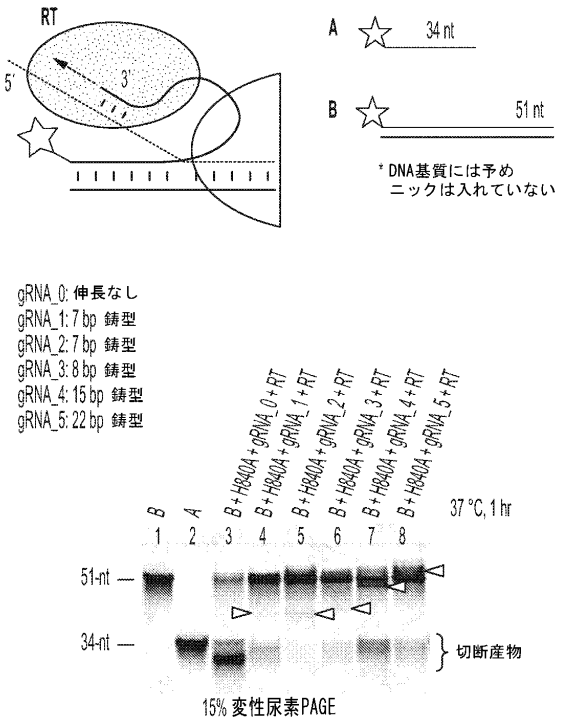


図 6

【図７】

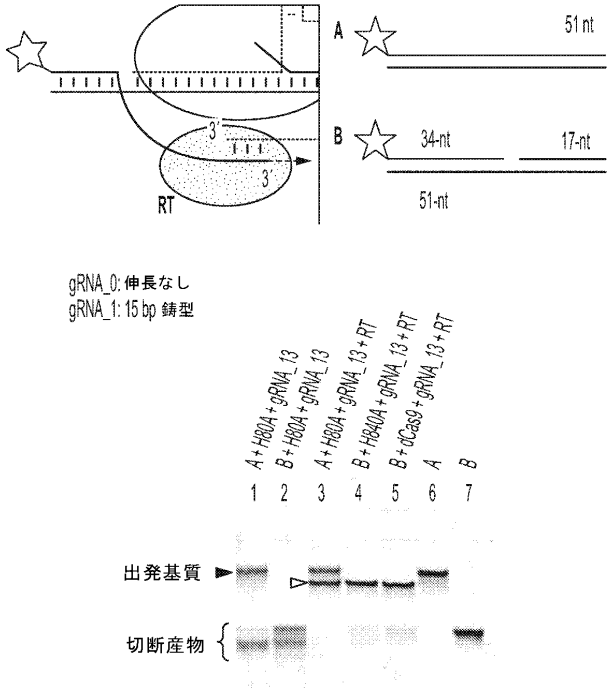


図 7

【図８】

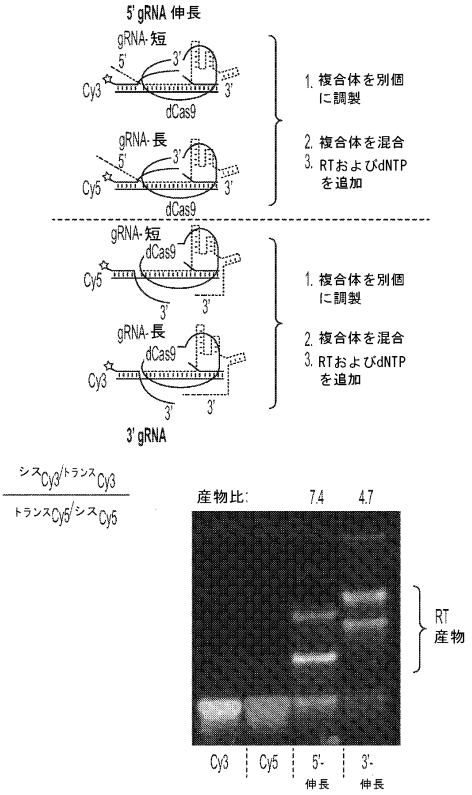


図８

【図９Ａ－Ｂ】

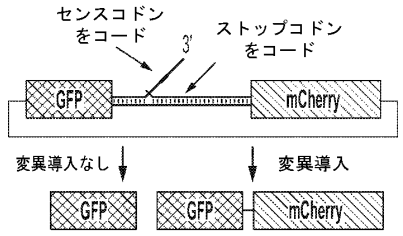


図 9A

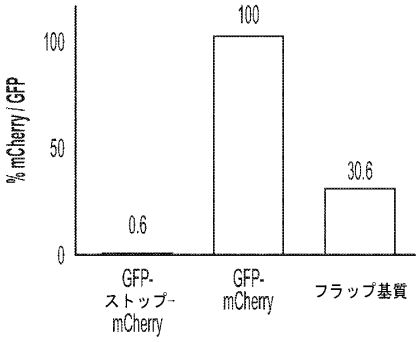


図 9B

【図９Ｃ－Ｄ】

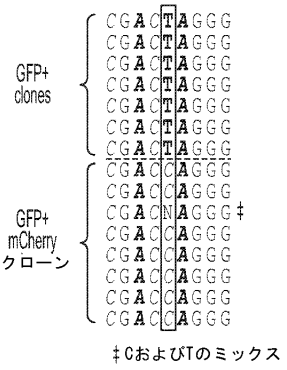


図 9C

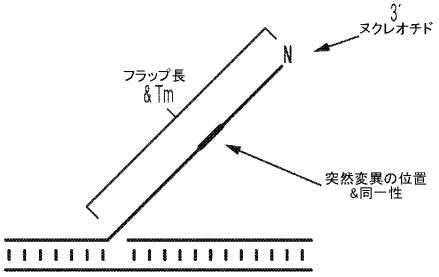


図 9D

【図１０】

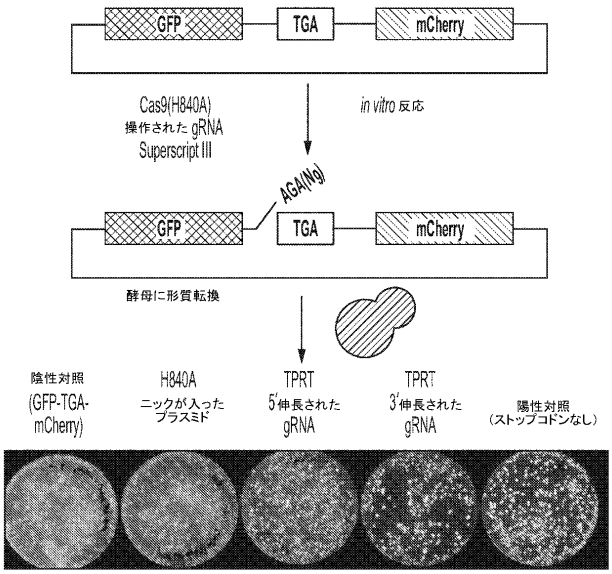


図 10

【図１１】

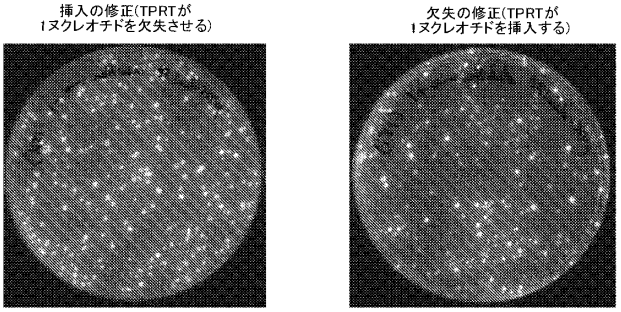


図11

【図１２】



図12

【図１３】

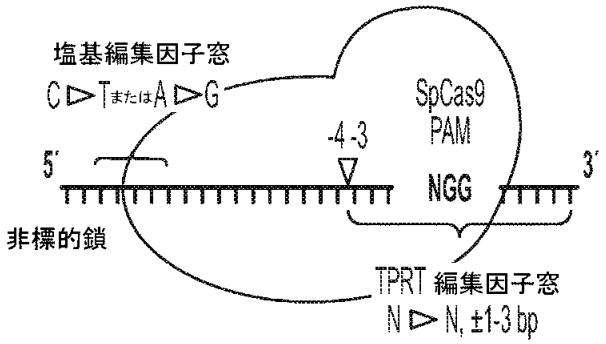


図13

【図１４】

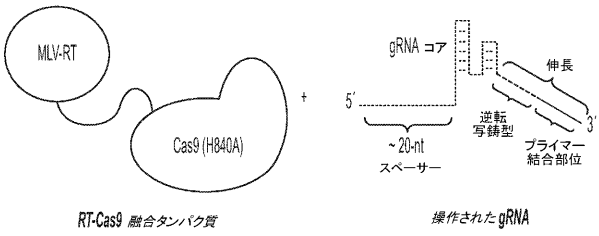


図14

【図１５】

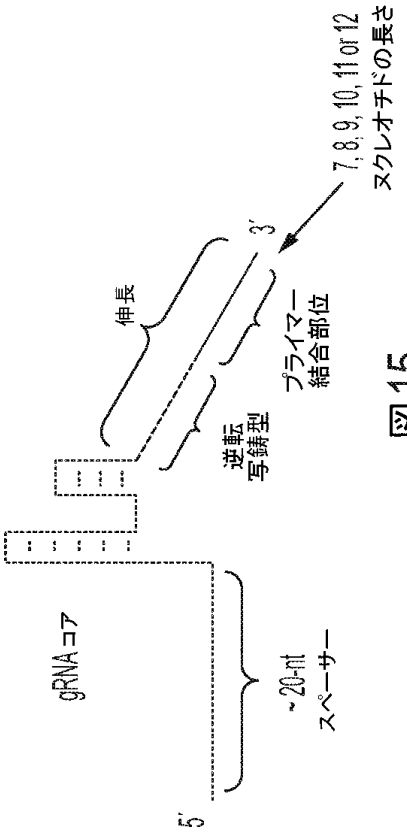


図15

【図１６】

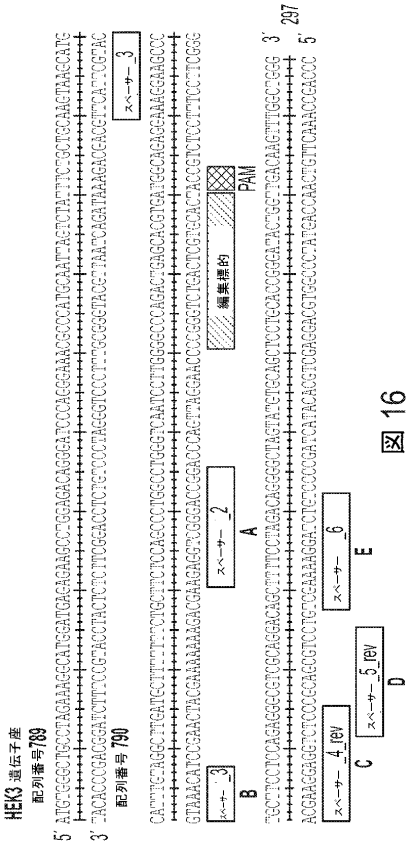


図16

【図１７】

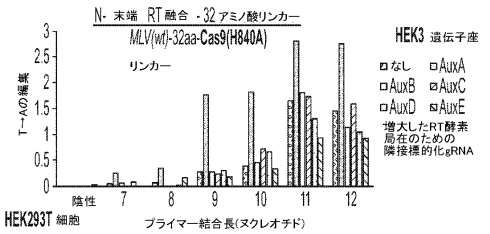


図17A

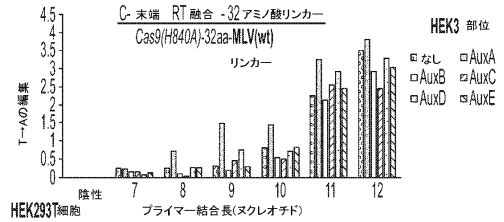


図17B

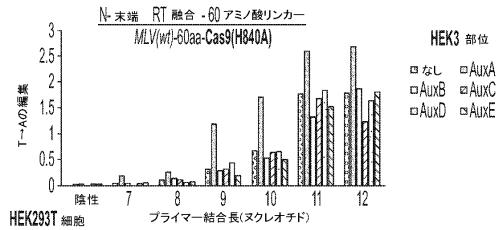


図17C

【図１８】

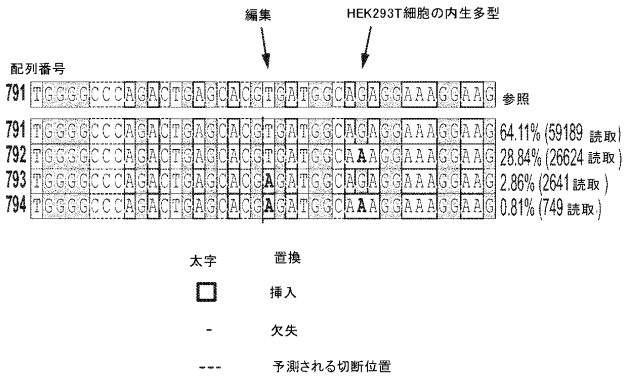


図18

【図１９】

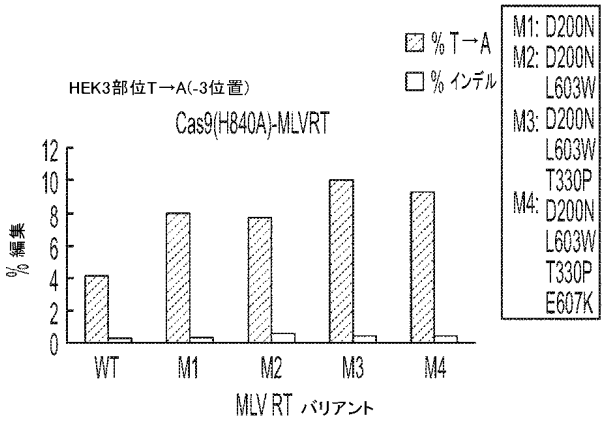


図19

【図２０】

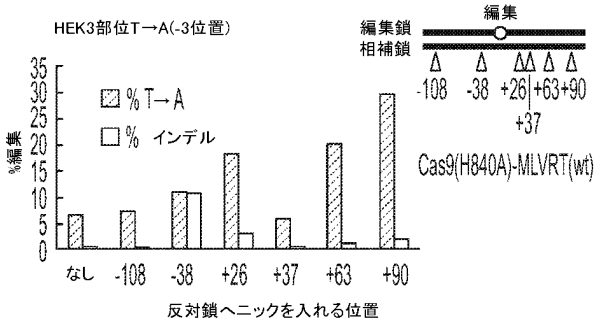


図 20

【図２１】

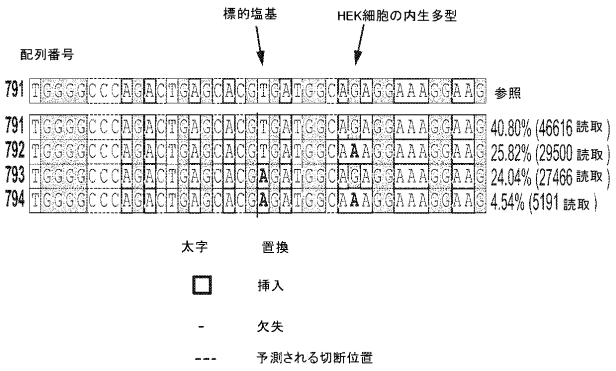


図 21

【図２２】

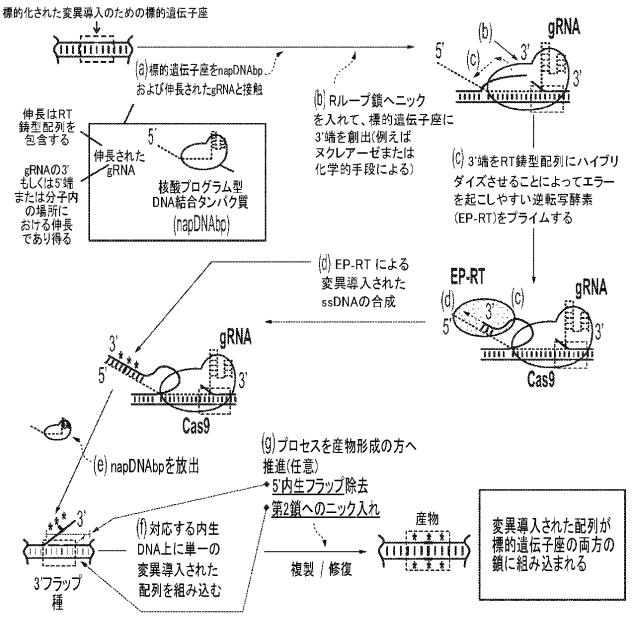


図 22

【図２３】

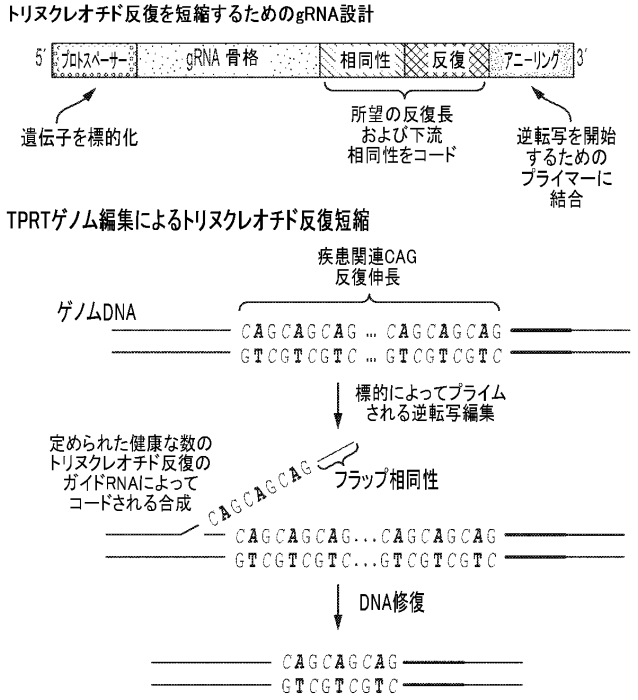


図 23

【図２４】

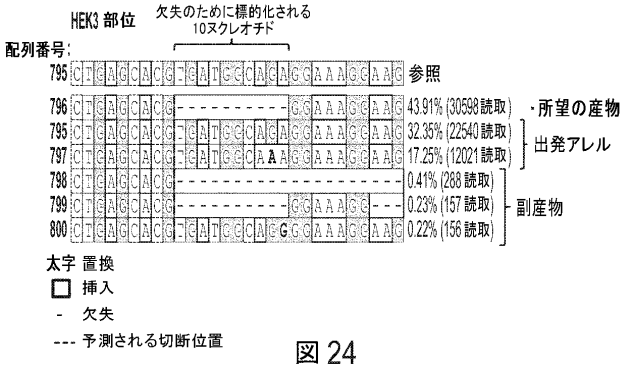


図 24

【図２５】

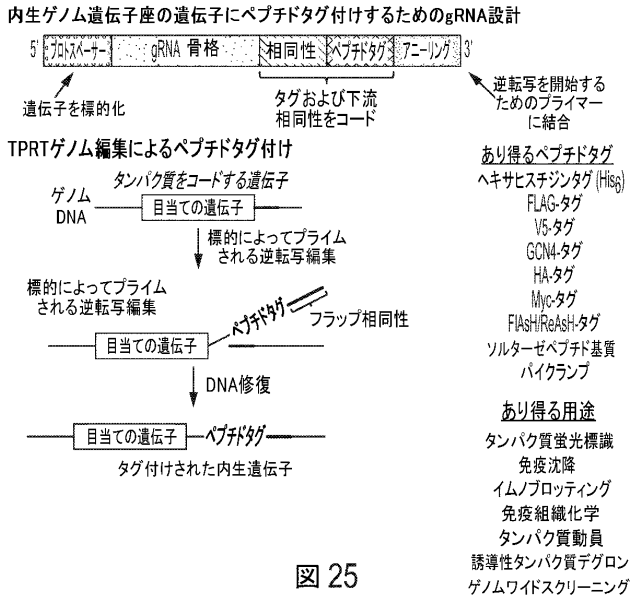


図 25

【図２６】

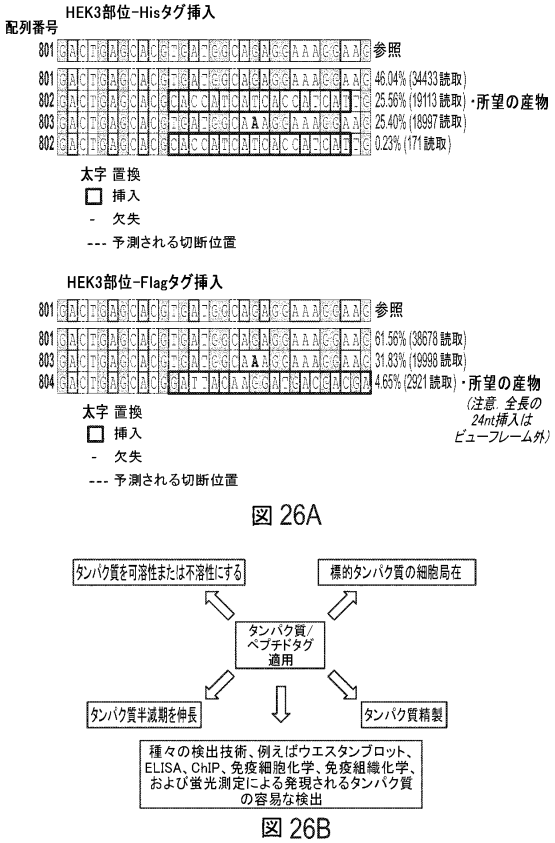


図 26A

図 26B

【図２７】

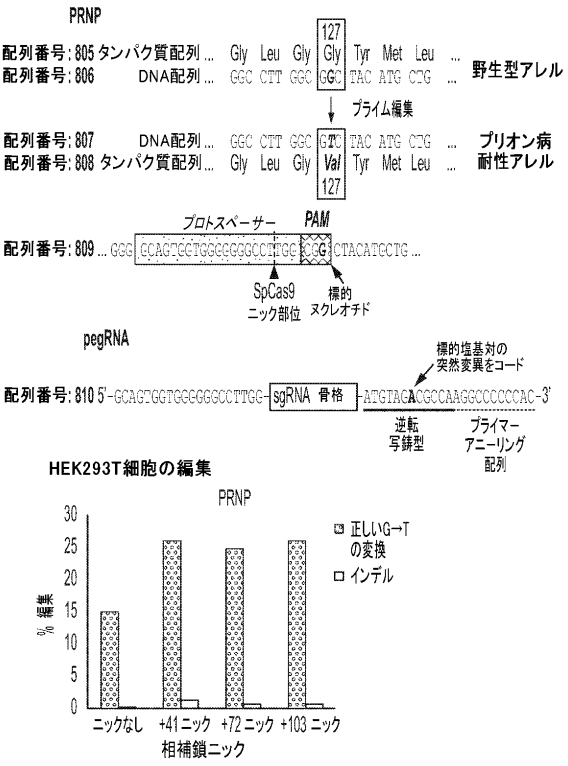


図 27

【図２８】

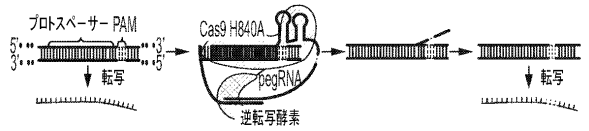


図 28A

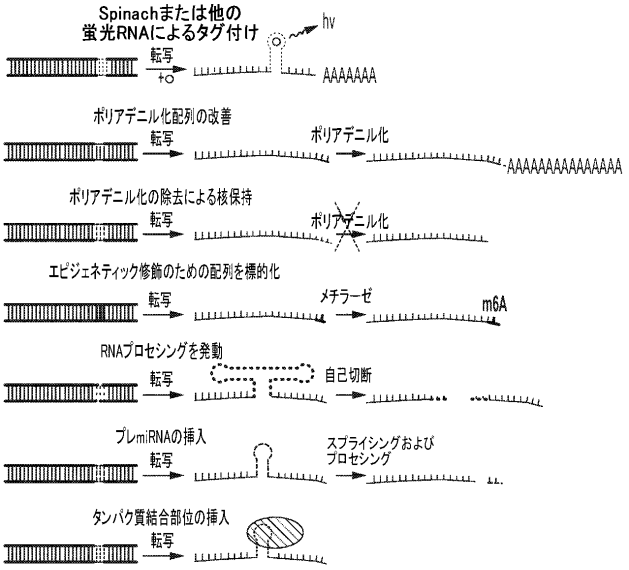


図 28B

【図２９Ａ】

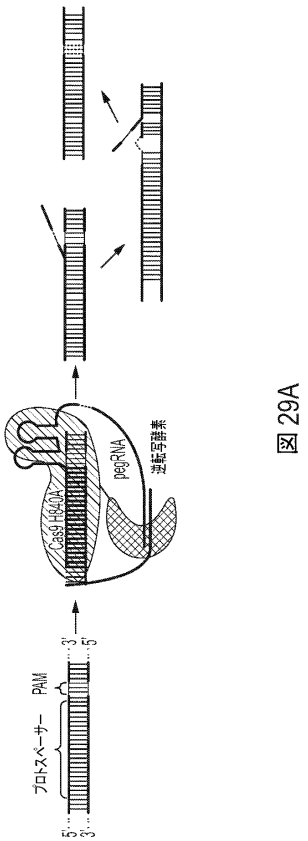


図 29A

【図２９Ｂ】

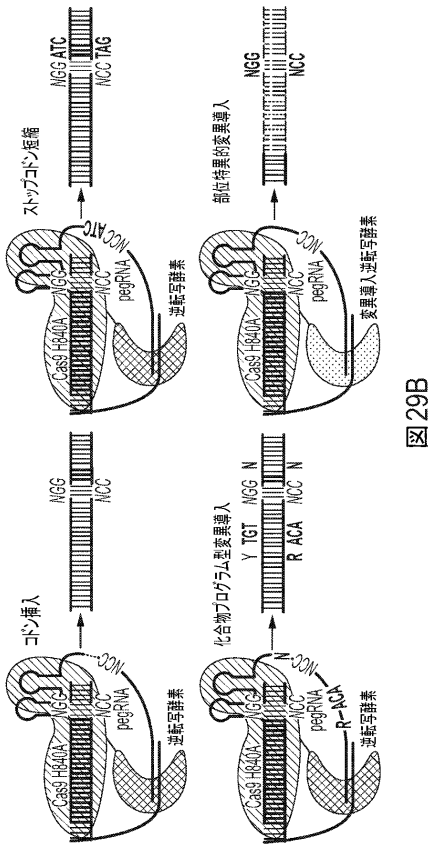


図 29B

【図２９Ｃ】

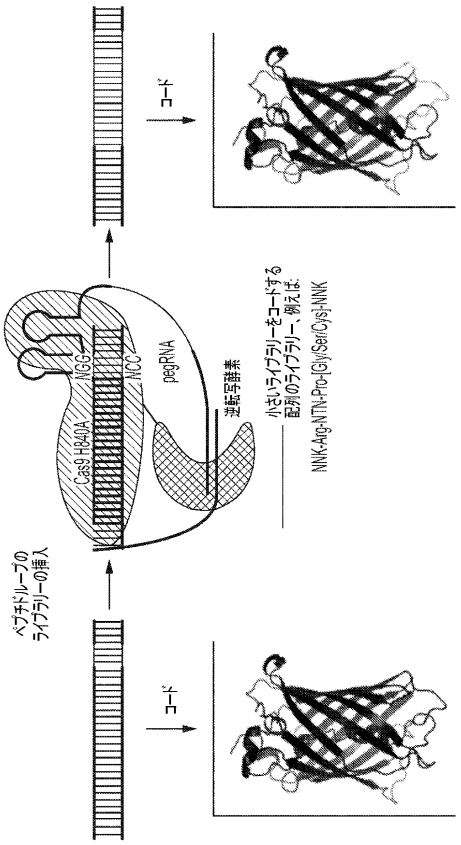


図29C

【図２９Ｄ】

プログラム型コドン欠失および短縮

配列番号:811	GFP	NFKIRENIEDGSVQLADHYQQNTPI
配列番号:812	del5	NFKI-ENIEDGSVQLADHYQQNTPI
配列番号:813	del6	NFKIR-NIEDGSVQLADHYQQNTPI
配列番号:814	del8	NFKIREN-EDGSVQLADHYQQNTPI
配列番号:815	del 8-13	NFKIREN-----QLADHYQQNTPI
配列番号:816	del 1-5	-----ENIEDGSVQLADHYQQNTPI
配列番号:817	del 15-25	NFKIRENIEDGSVQ----------

図29D

【図３０】

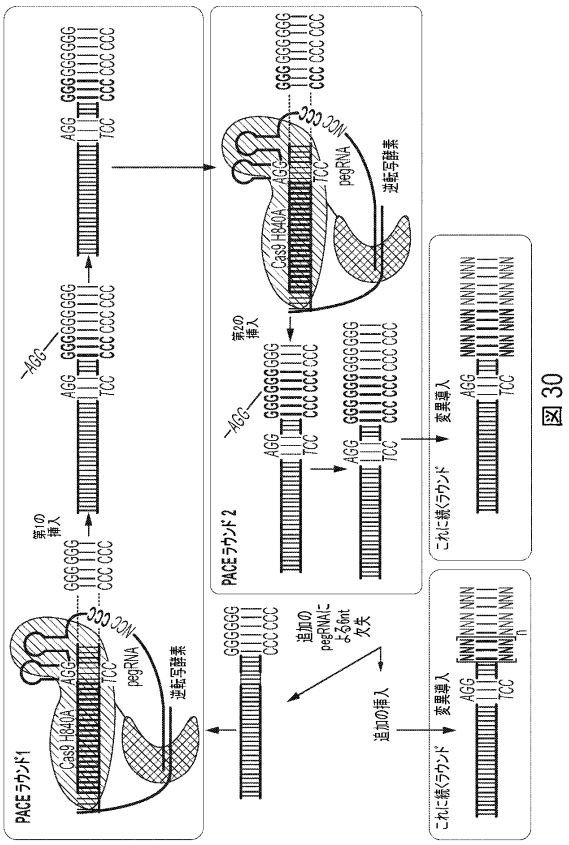


図30

【図３１】

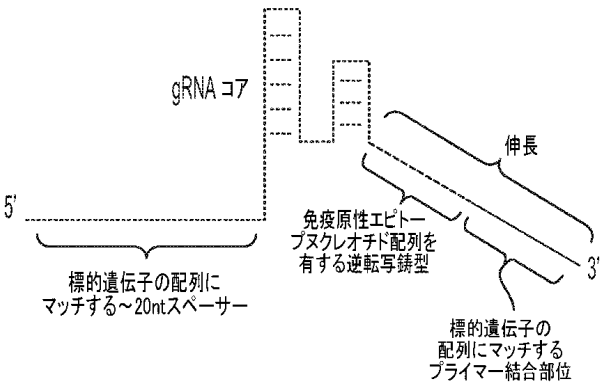


図31

【図３２】

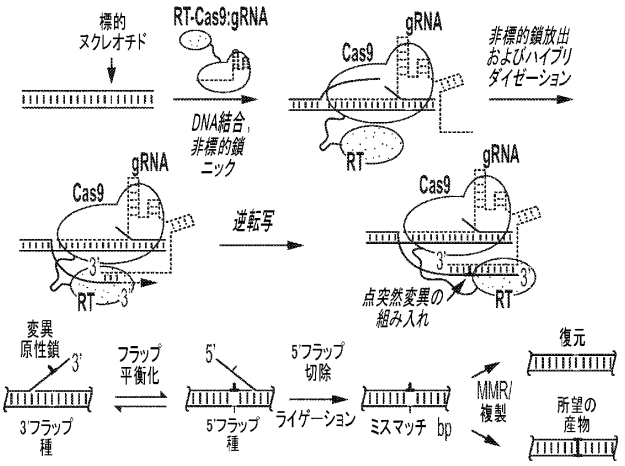


図 32

【図３３】

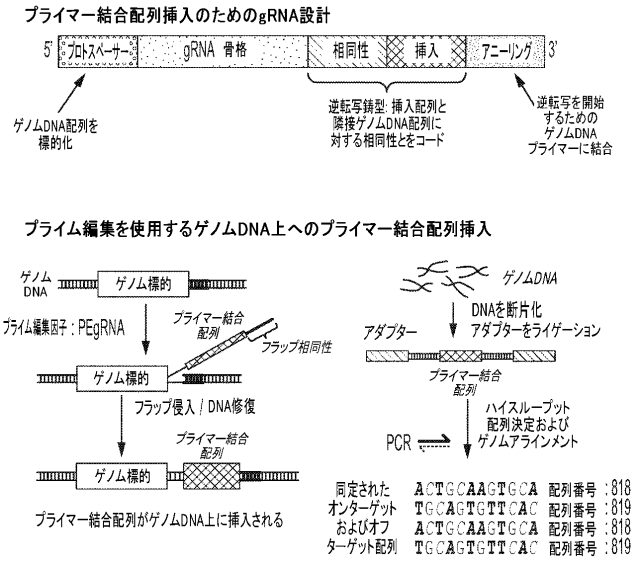


図 33

【図３４】

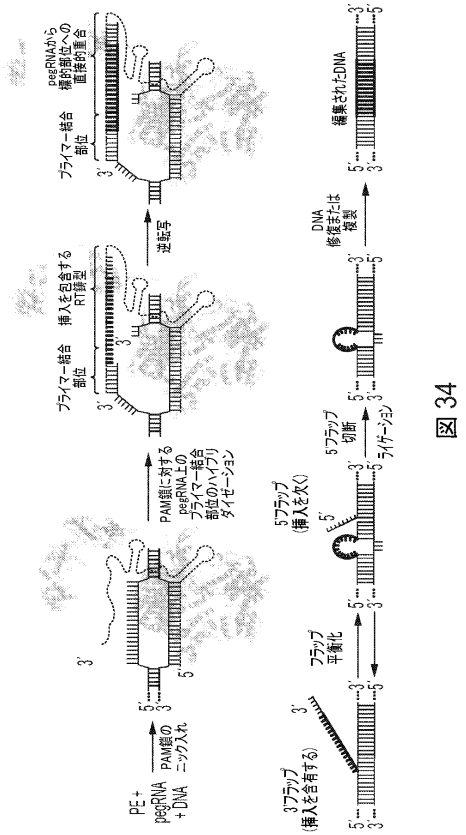


図 34

【図３５】

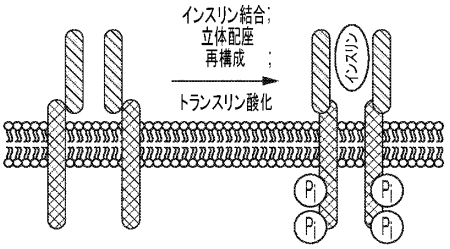


図 35A

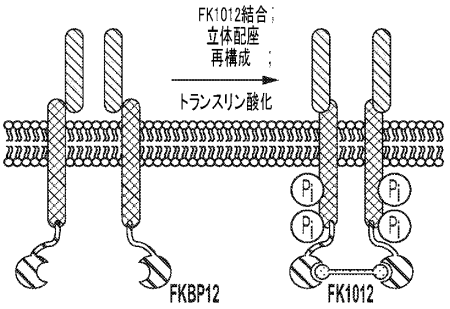


図 35B

【図３６】

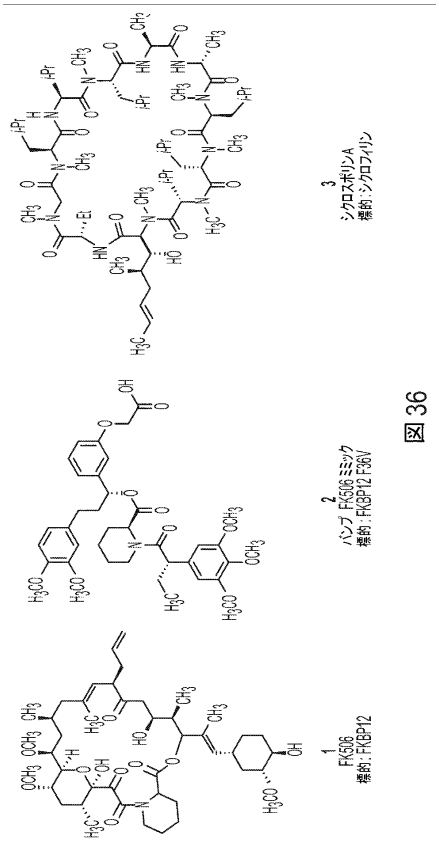


図 36

【図３７Ａ】

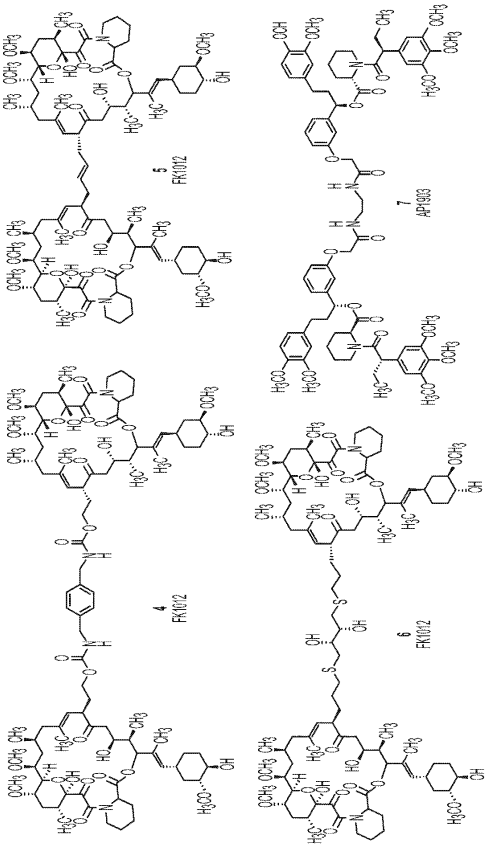


図 37A

【図３７Ｂ】

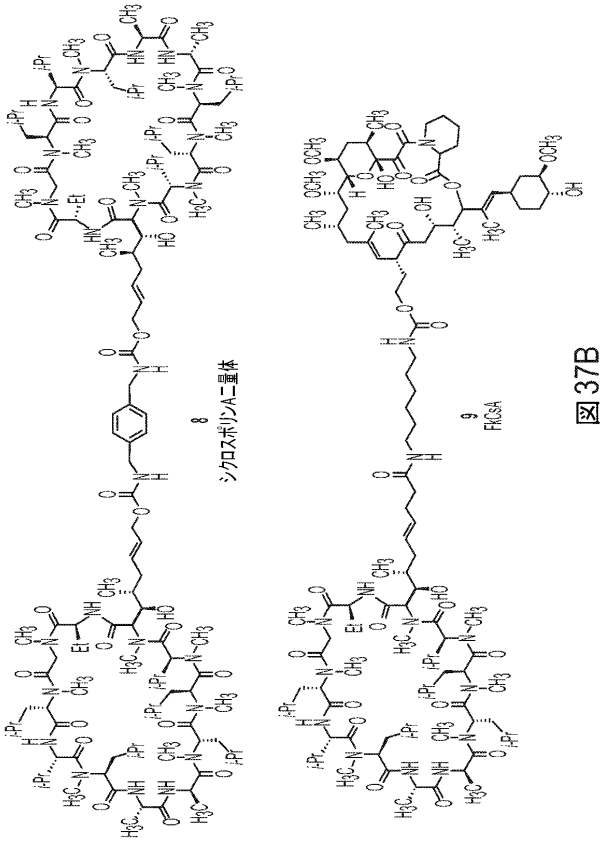


図 37B

【図３８Ａ－Ｂ】

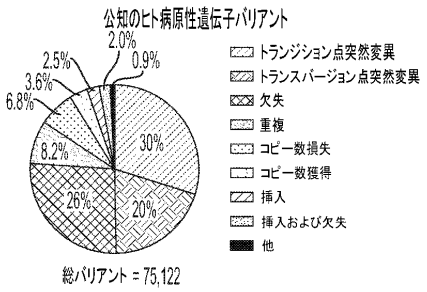


図 38A

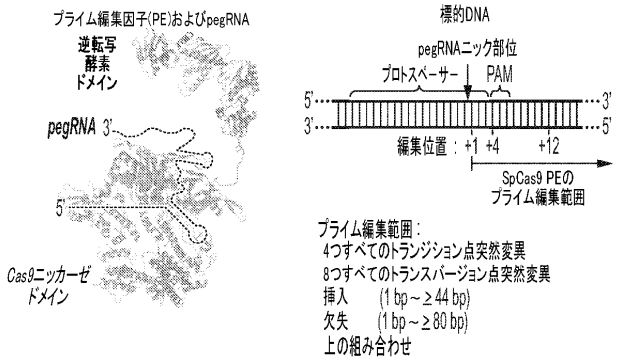


図 38B

【図３８Ｃ－Ｄ】

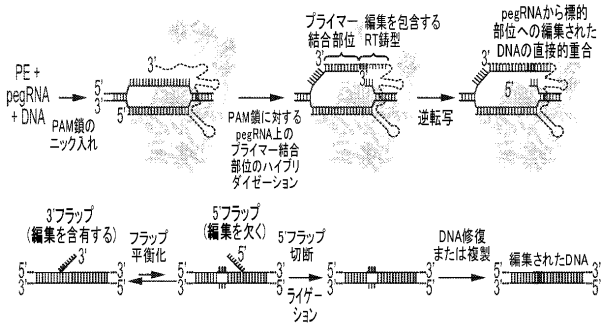


図38C

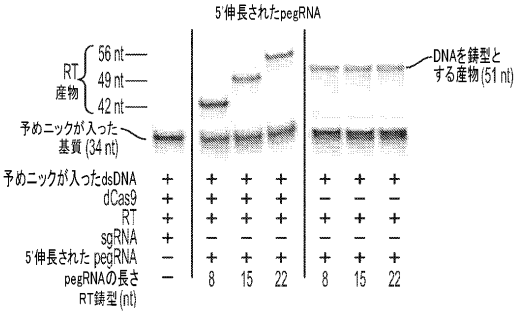


図38D

【図３８Ｅ－Ｆ】

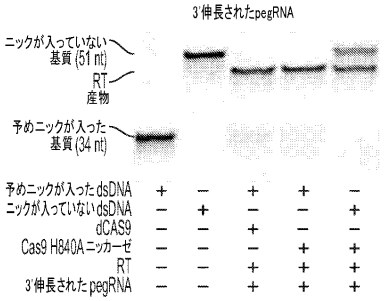


図38E

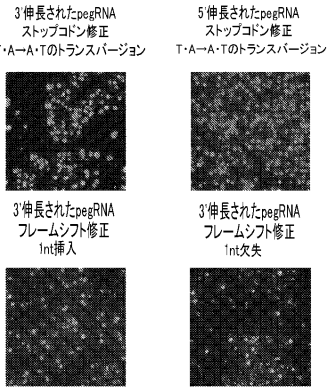


図38F

【図３９Ａ－Ｂ】

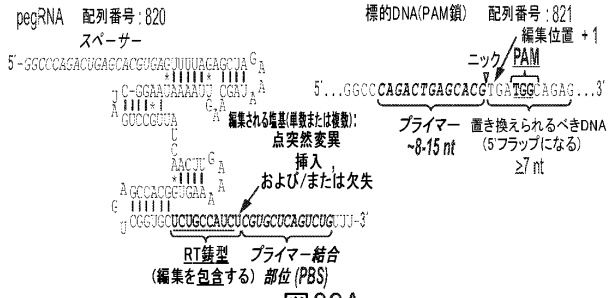


図39A

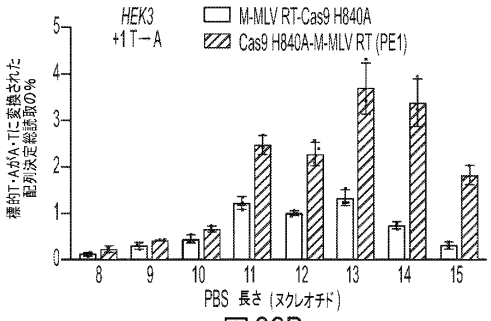


図39B

【図３９Ｃ】

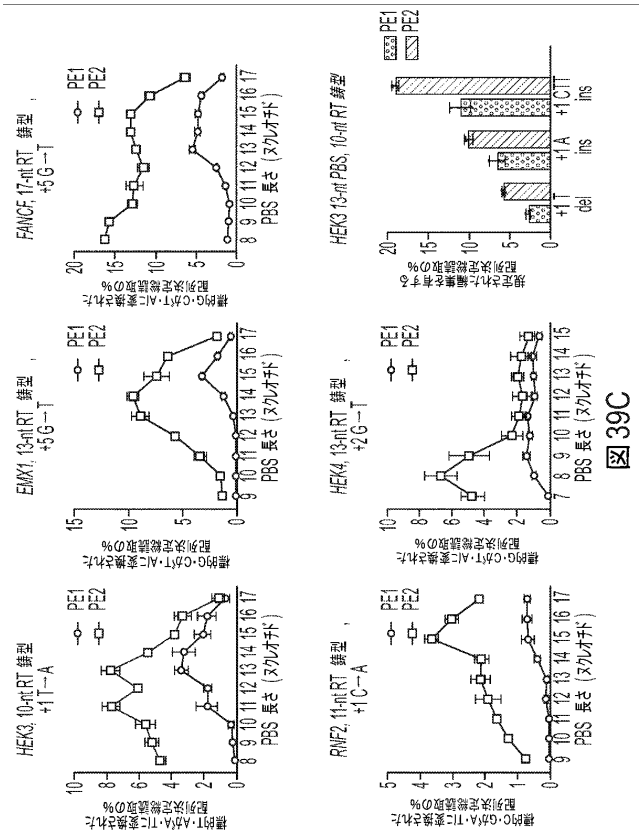


図39C

【図３９Ｄ】

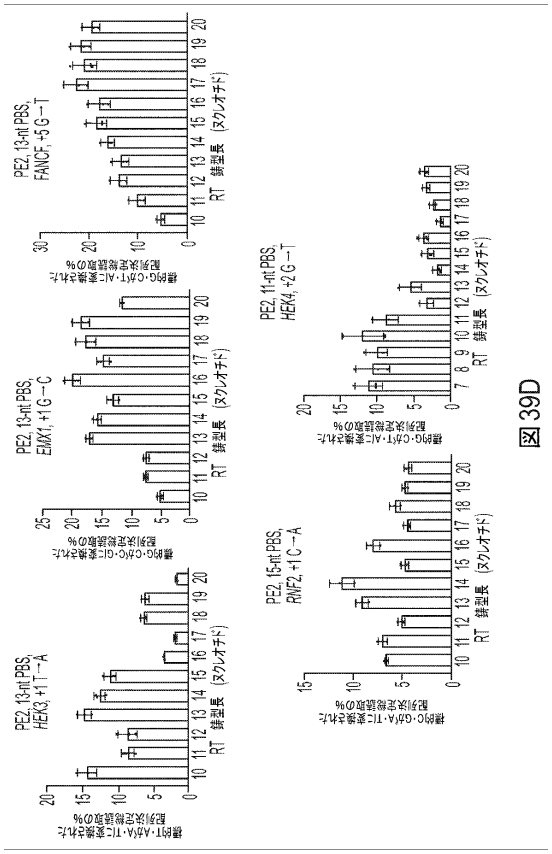


図 39D

【図４０Ａ】

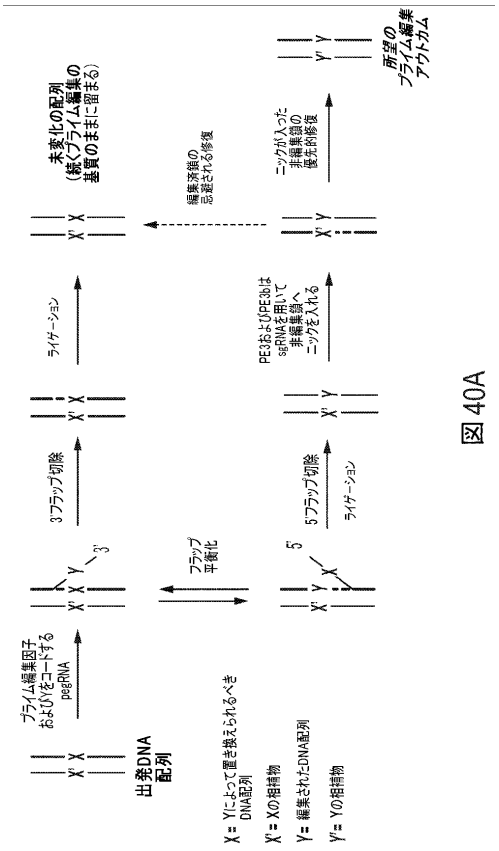


図 40A

【図４０Ｂ】

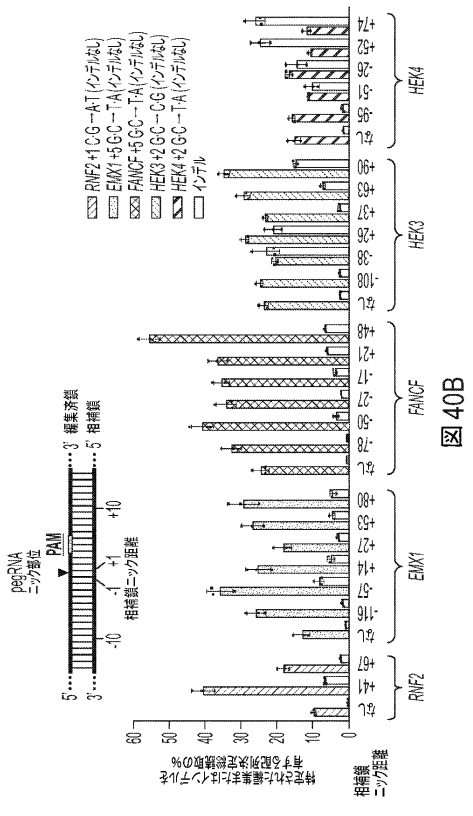


図 40B

【図４０Ｃ】

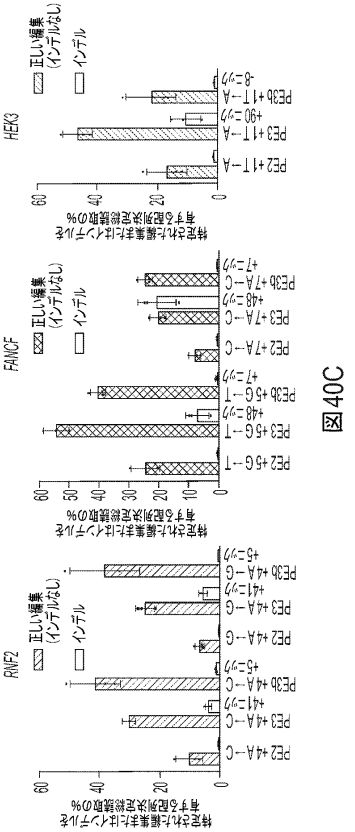


図 40C

【図４１Ａ】

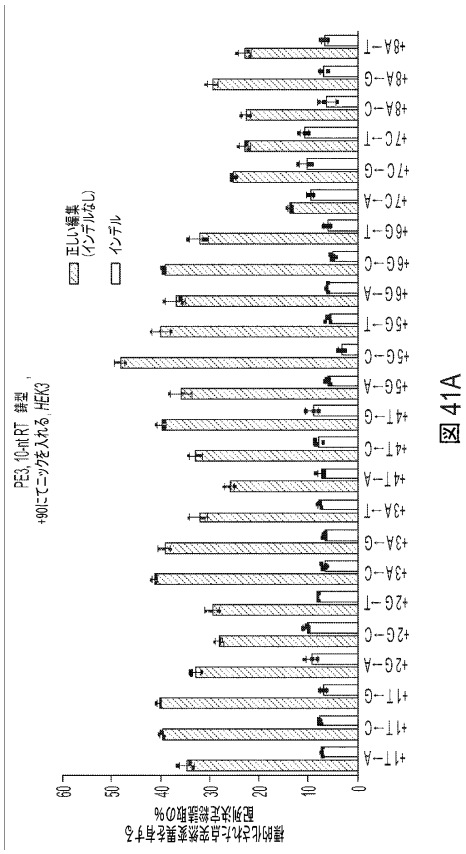


図 41A

【図４１Ｂ－Ｃ】

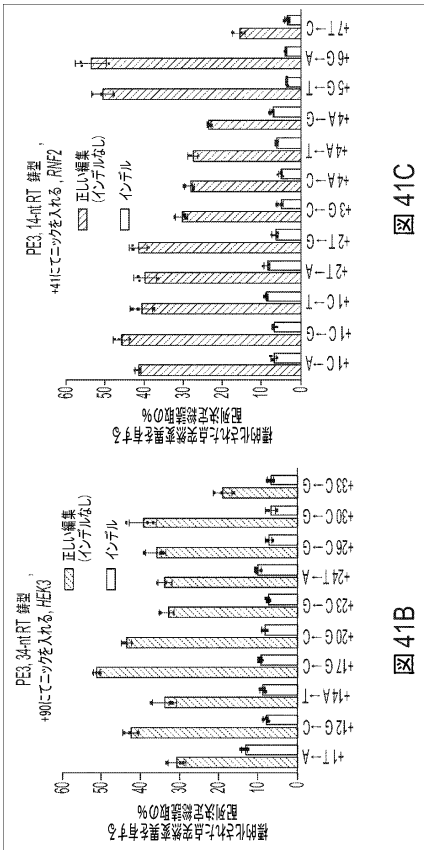


図 41C

図 41B

【図４１Ｄ－Ｅ】

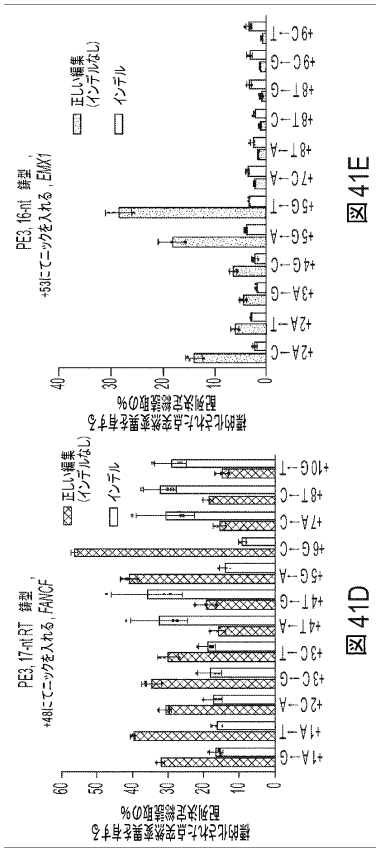


図 41D

図 41E

【図４１Ｆ－Ｇ】

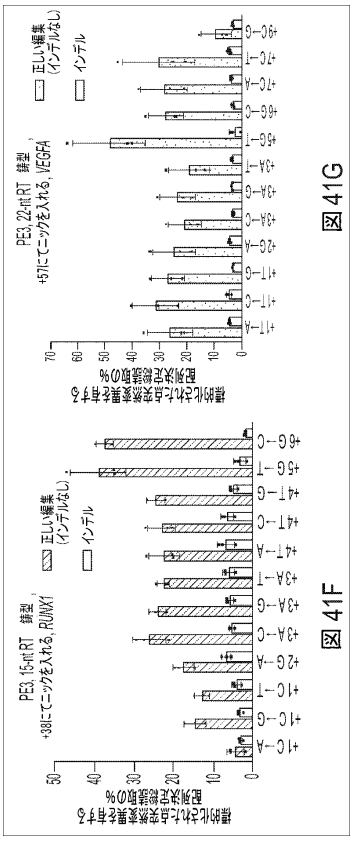


図 41F

図 41G

【図４１Ｈ】

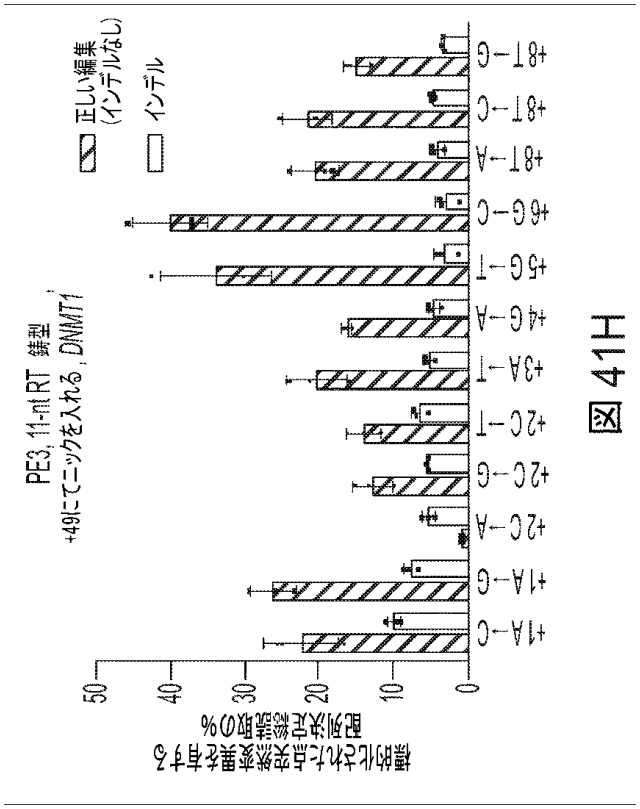


図41H

【図４１Ｉ】

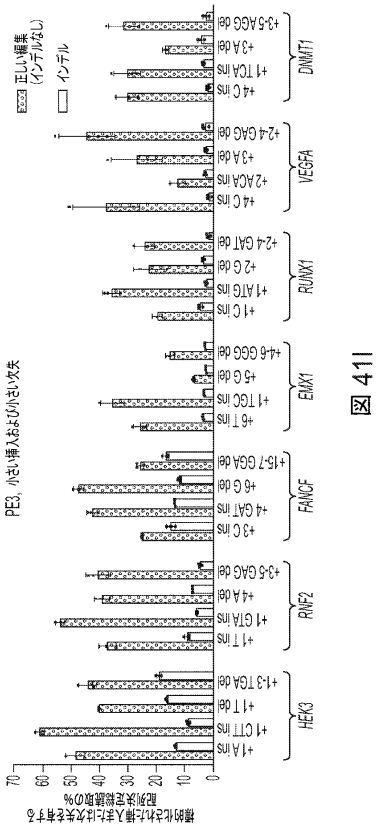


図41I

【図４１Ｊ－Ｋ】

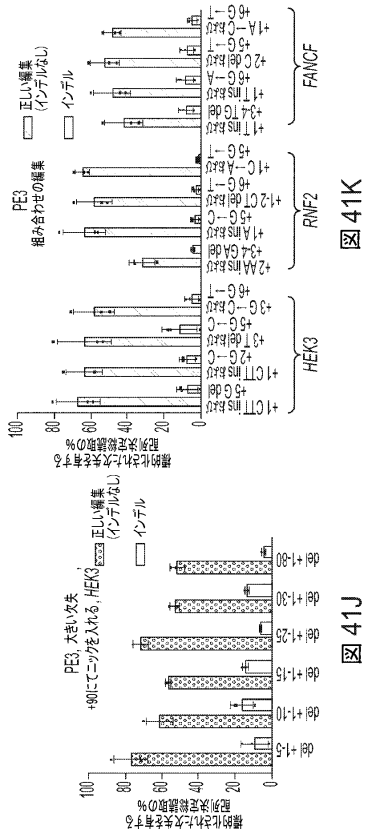


図41J

図41K

【図４２Ａ－Ｂ】

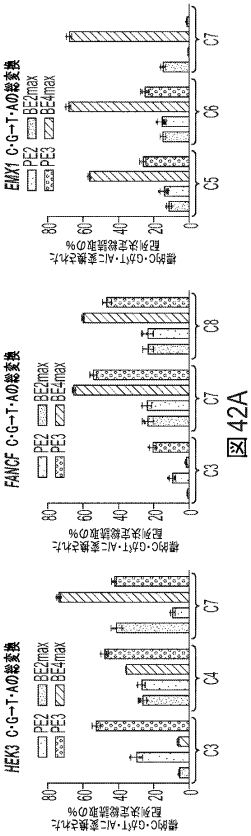


図42A

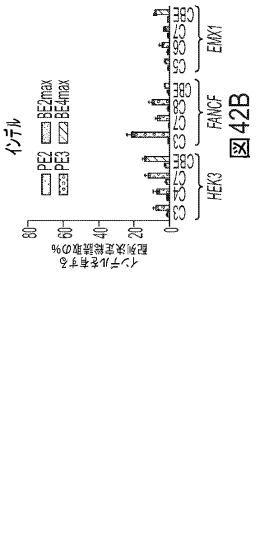


図42B

【図４２Ｃ】

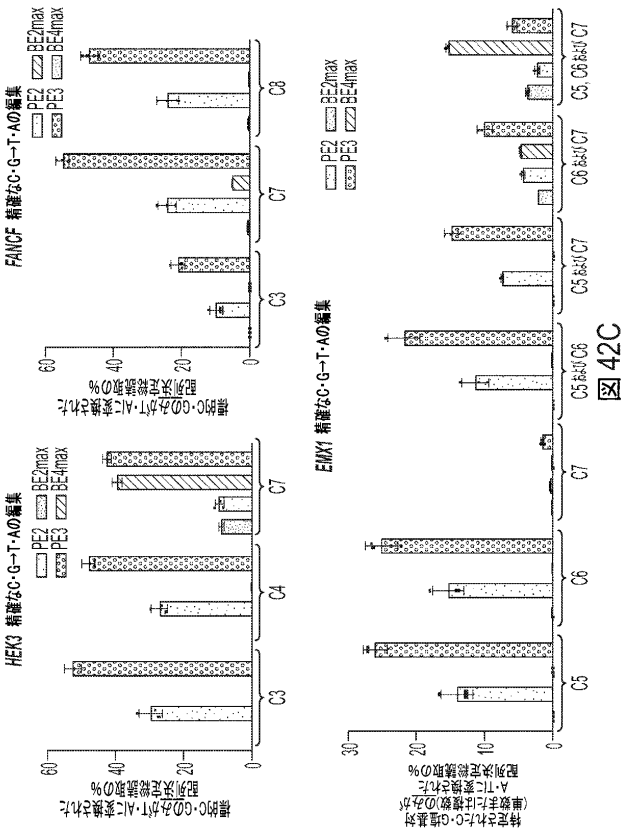


図 42C

【図４２Ｄ－Ｆ】

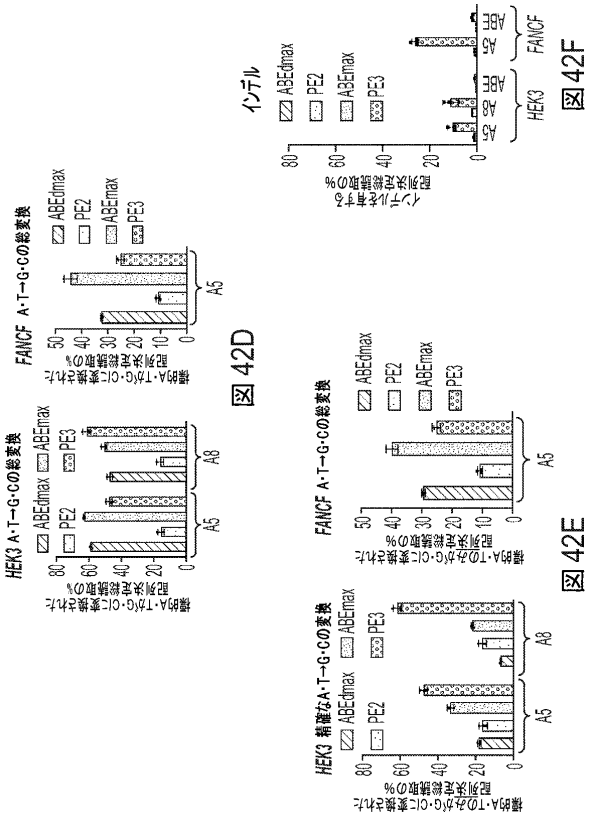


図 42D

図 42E

図 42F

【図４２Ｇ】

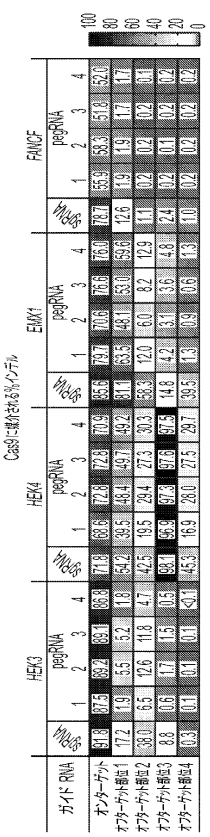


図 42G

【図４２Ｈ】

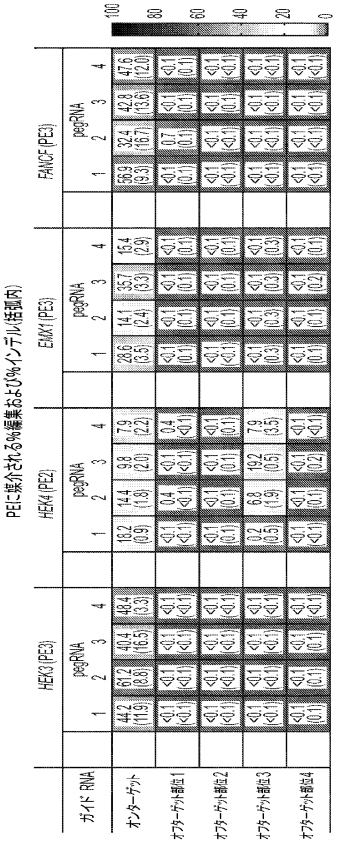


図 42H

【図４３Ａ－Ｃ】

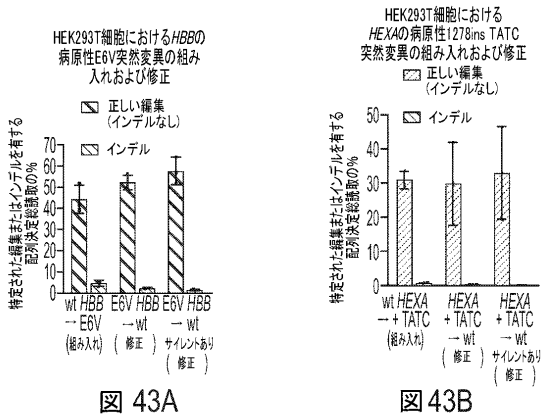


図 43A　図 43B　図 43C

【図４３Ｄ－Ｅ】

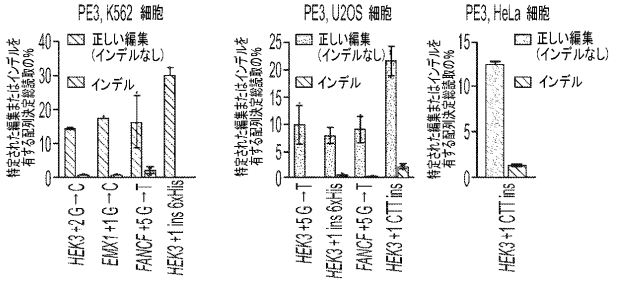


図 43D

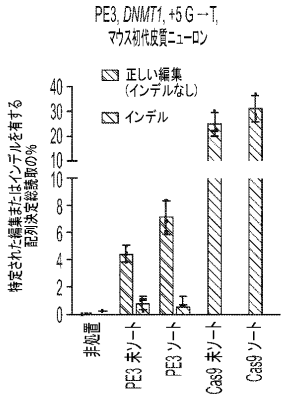


図 43E

【図４３Ｆ－Ｇ】

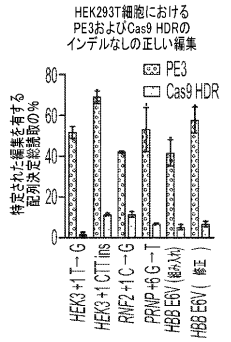


図 43F

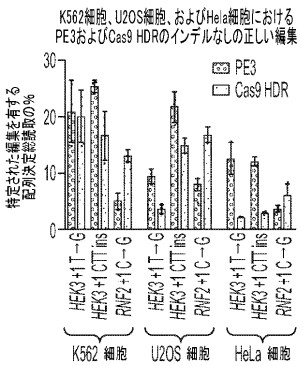


図 43G

【図４３Ｈ－Ｉ】

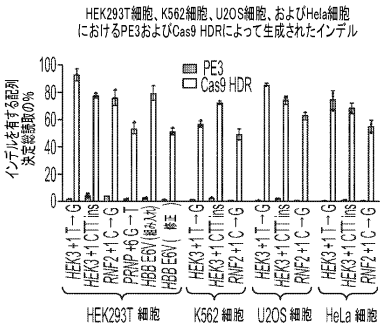


図 43H

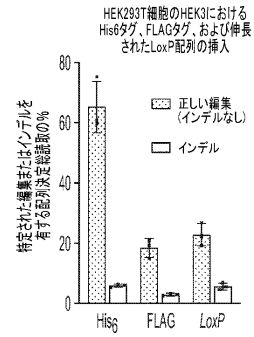


図 43I

【図４４Ａ－Ｂ】

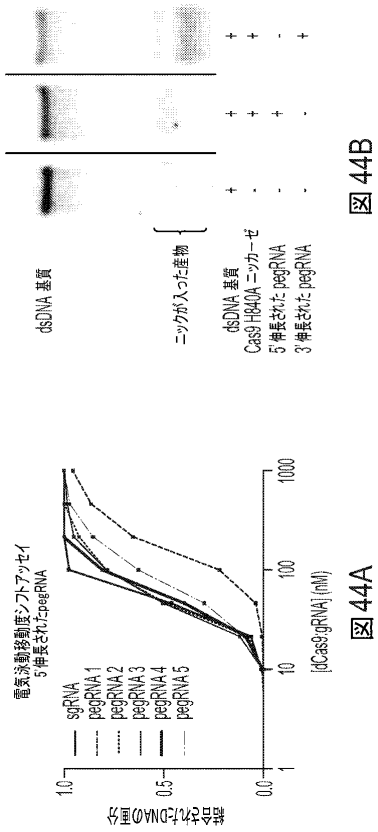


図 44B

図 44A

【図４４Ｃ】

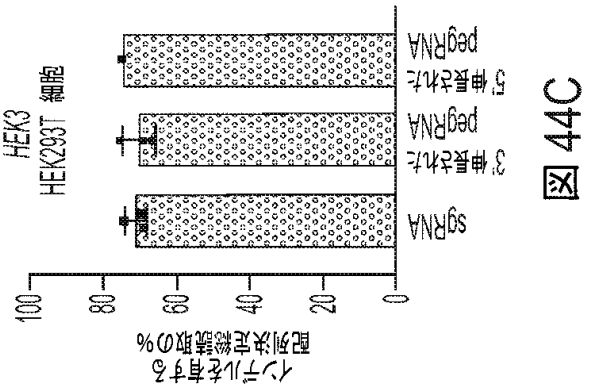


図 44C

【図４４Ｄ】

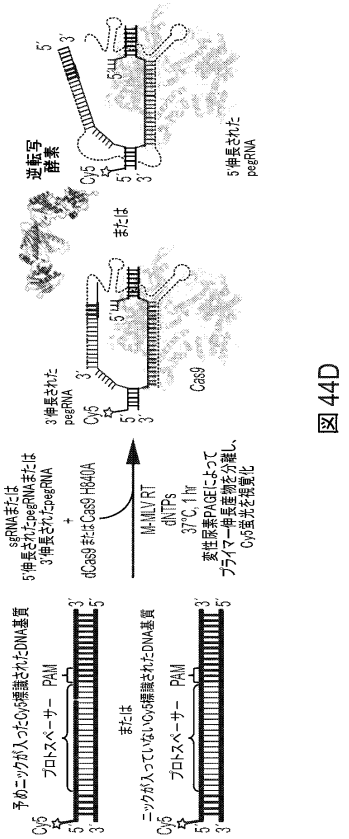


図 44D

【図４４Ｅ－Ｆ】

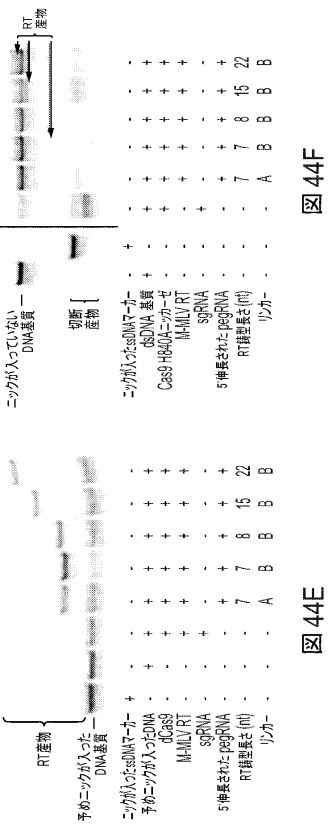


図 44E

図 44F

【図４４Ｇ】

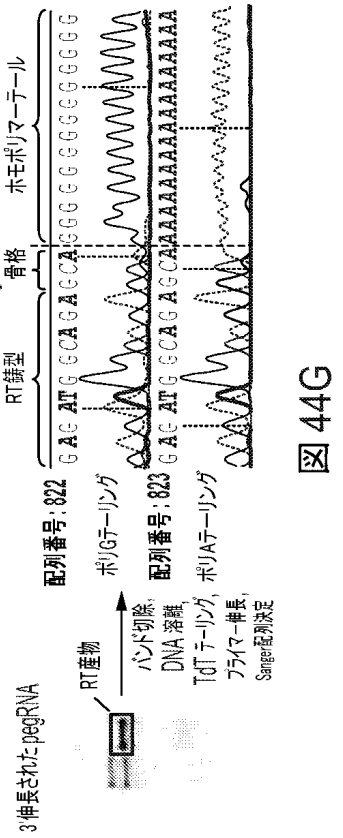


図 44G

【図４５Ａ】

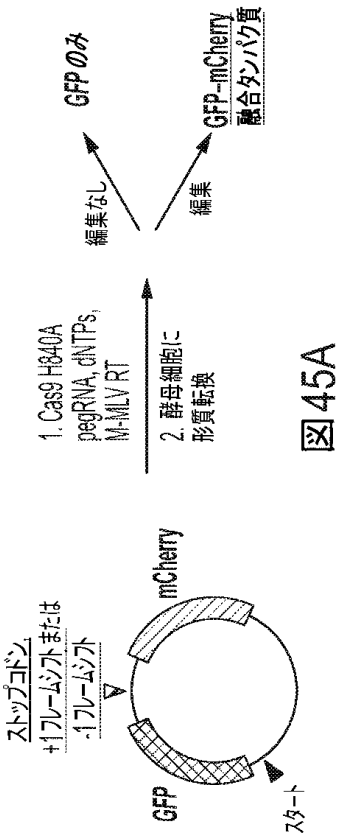


図 45A

【図４５Ｂ】

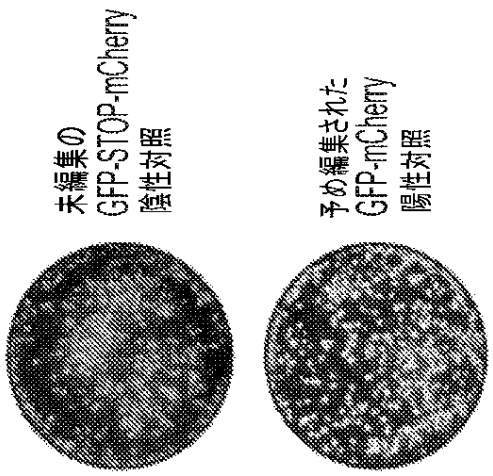


図 45B

【図４５Ｃ－Ｄ】

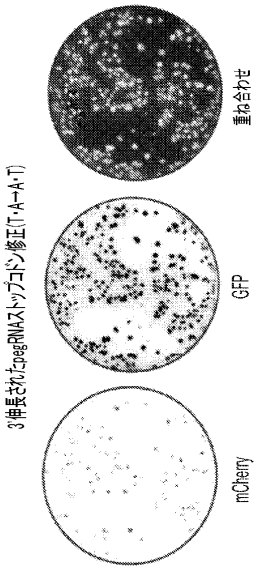


図 45C

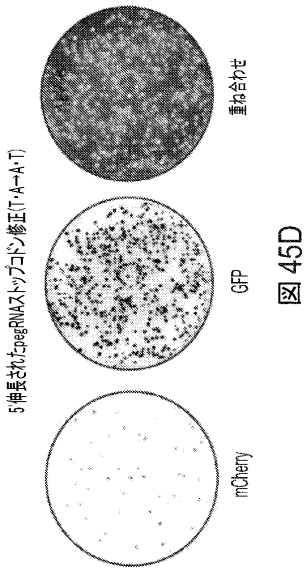
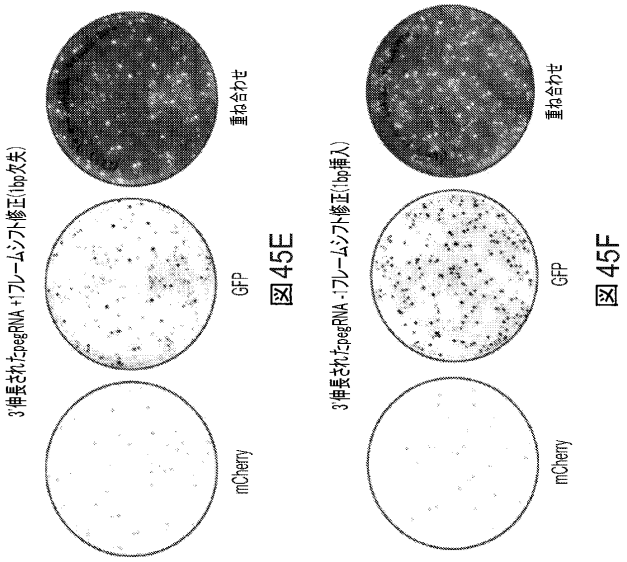
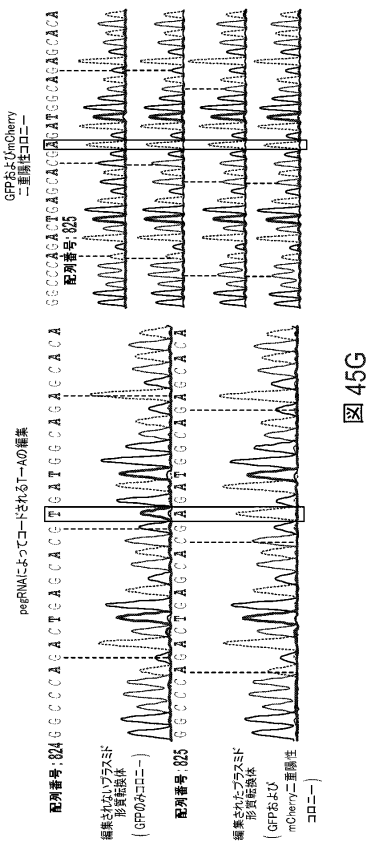


図 45D

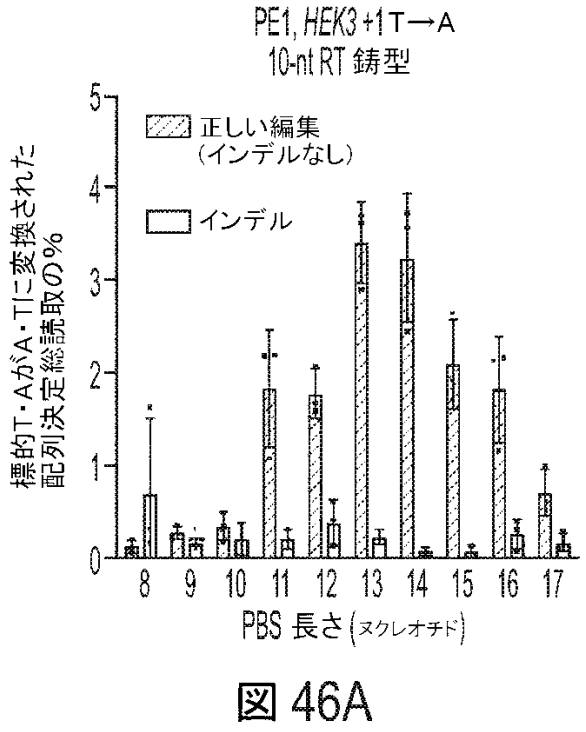
【図４５Ｅ－Ｆ】



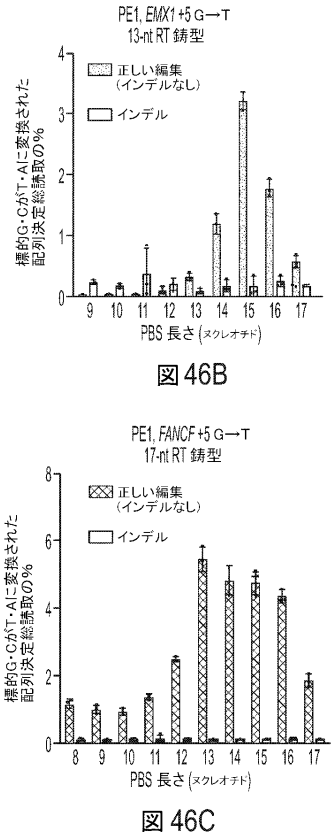
【図４５Ｇ】



【図４６Ａ】



【図４６Ｂ－Ｃ】



【図４６Ｄ－Ｅ】

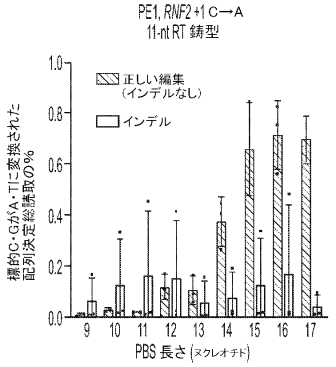


図46D

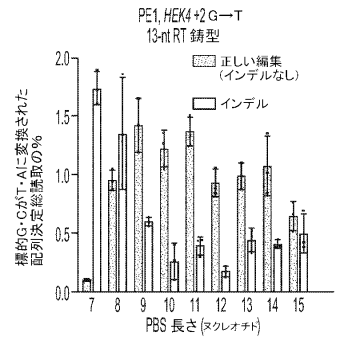


図 46E

【図４６Ｆ】

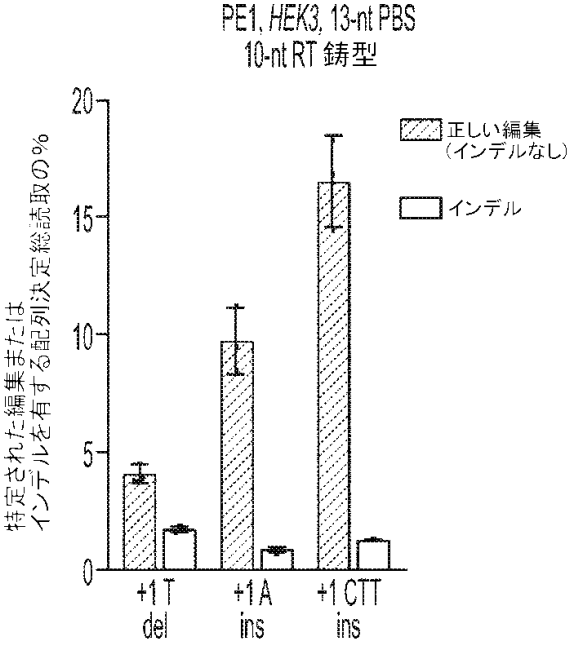


図 46F

【図４７Ａ】

PE1	Cas9 H840A-M-MLV RT (wt)
PE1-M1	Cas9 H840A-M-MLV RT (D200N)
PE1-M2	Cas9 H840A-M-MLV RT (D200N+L603W)
PE1-M3	Cas9 H840A-M-MLV RT (D200N+L603W+T330P)
PE1-M6	Cas9 H840A-M-MLV RT (D200N+L603W+T330P+D524G+E562Q+D583N)
PE1-M15	Cas9 H840A-M-MLV RT (P51L+S67R+E67K+T197A+H204R+E302K+F309N+W1331F+T330P+L345G+N454K+D524G+D583N+H594Q+D653N)
PE1-M3inv	M-MLV RT (D200N+L603W+T330P)-Cas9 H840A
PE2	Cas9 H840A-M-MLV RT (D200N+L603W+T330P+T306K+W313F)

図 47A

【図４７Ｂ－Ｃ】

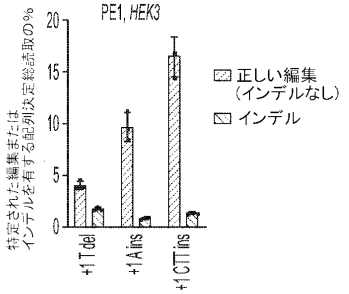


図 47B

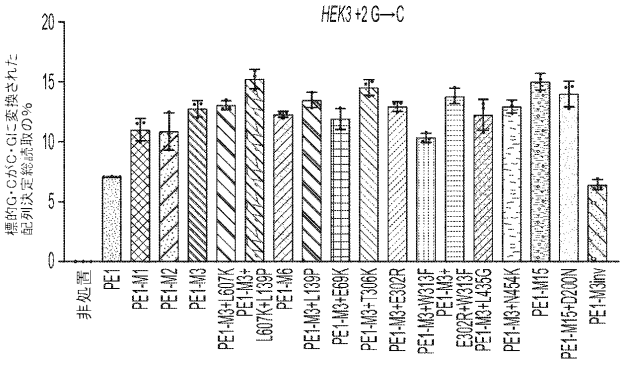


図 47C

【図４７Ｄ－Ｅ】

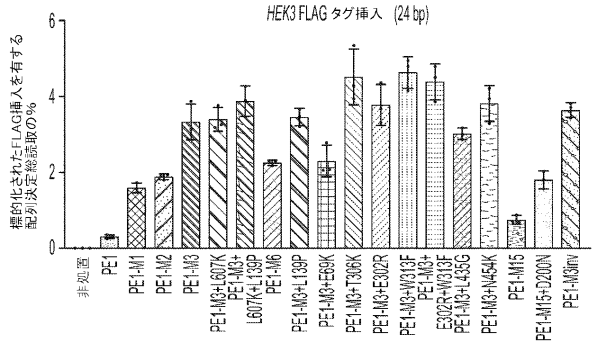


図47D

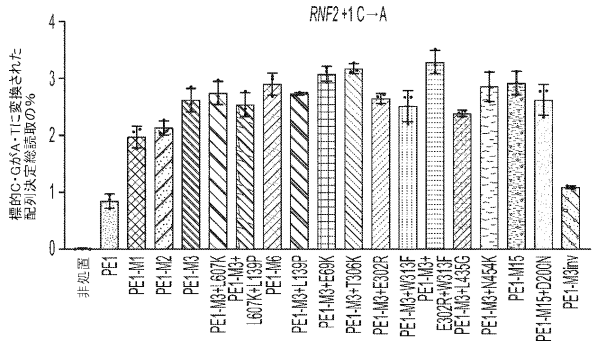


図47E

【図４７Ｆ－Ｇ】

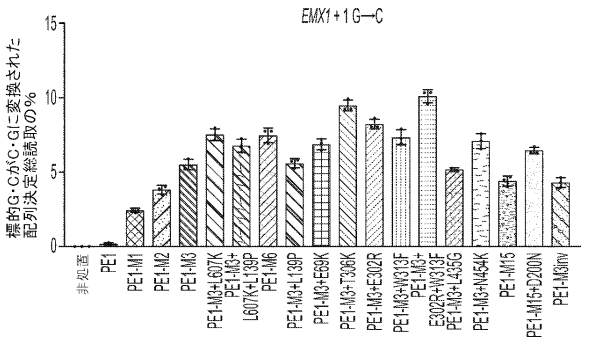


図47F

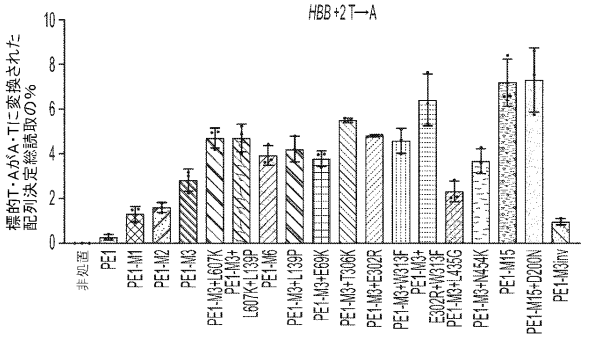


図47G

【図４７Ｈ－Ｉ】

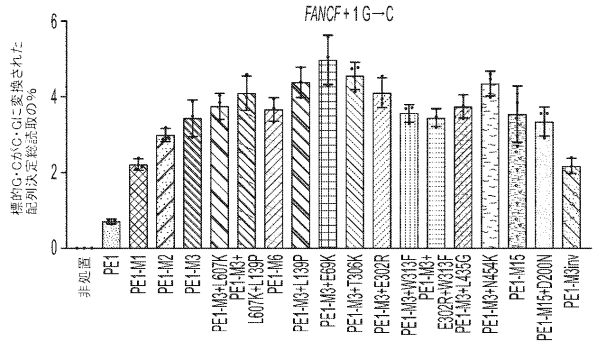


図47H

【図４７Ｊ－Ｋ】

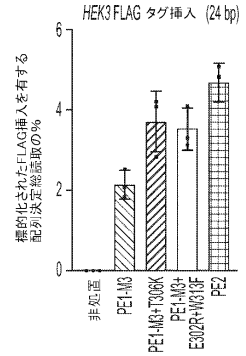


図47J

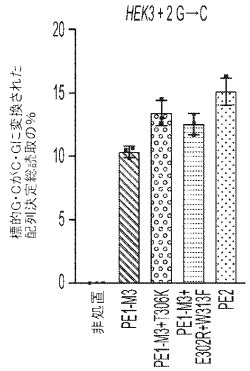


図47I

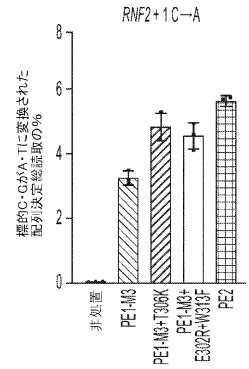


図47K

【図４７Ｌ－Ｍ】

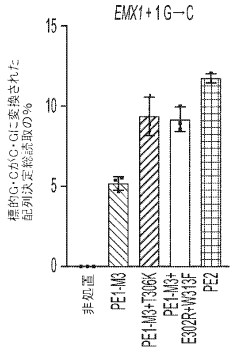


図 47L

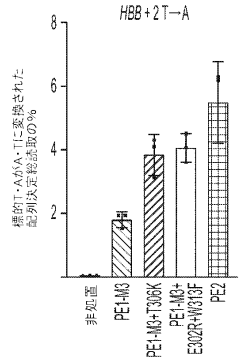


図 47M

【図４７Ｎ－Ｏ】

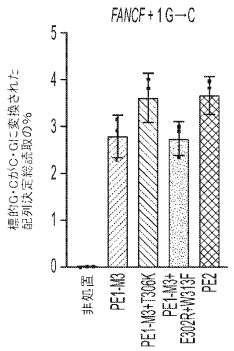


図 47N

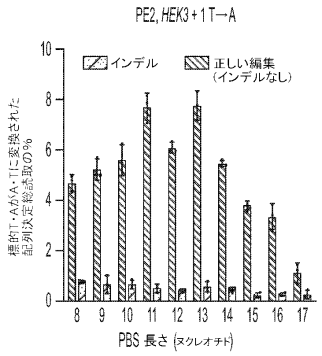


図 47O

【図４７Ｐ－Ｑ】

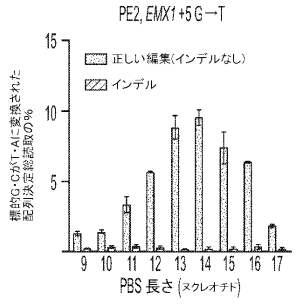


図 47P

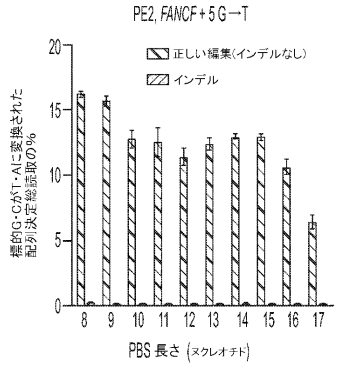


図 47Q

【図４７Ｒ－Ｓ】

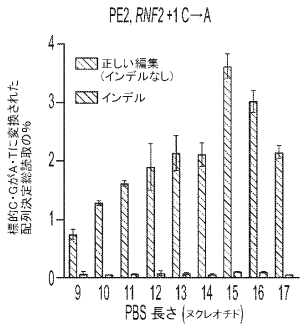


図 47R

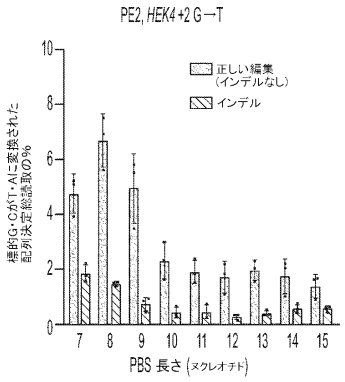


図 47S

【図４８】

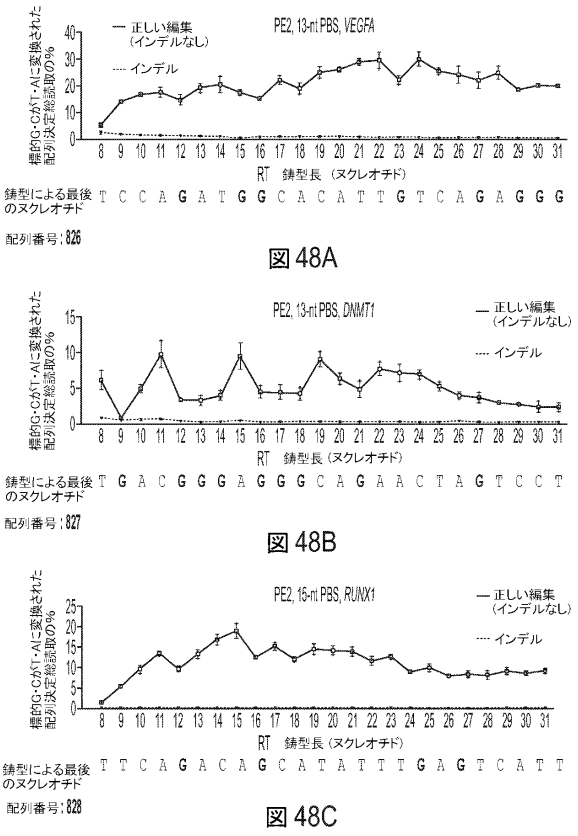


図48A

図48B

図48C

【図４９】

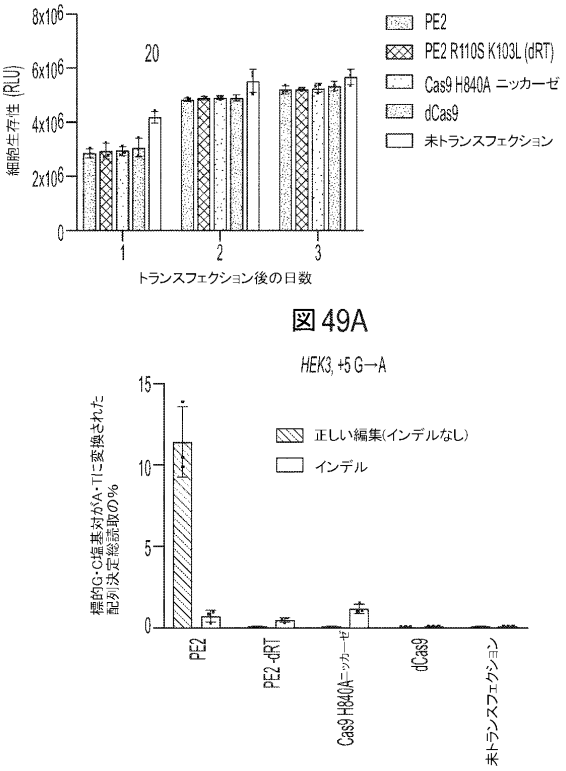


図49A

図49B

【図５０Ａ】

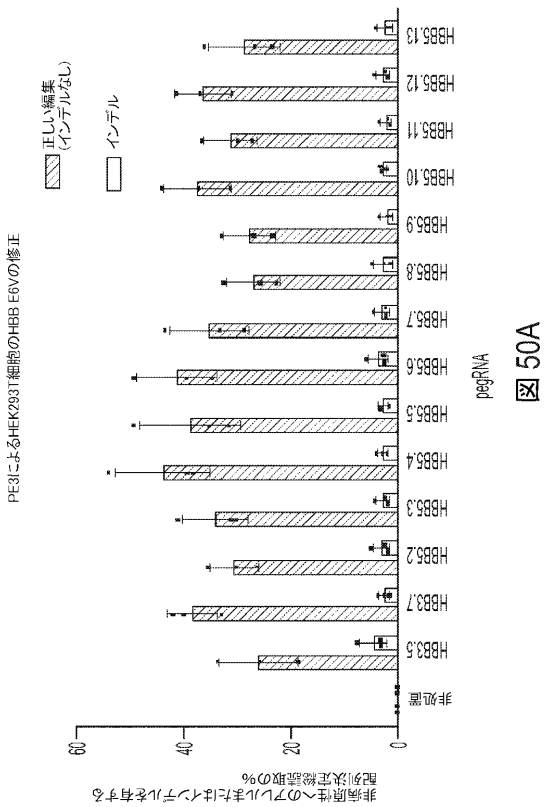


図50A

【図５０Ｂ】

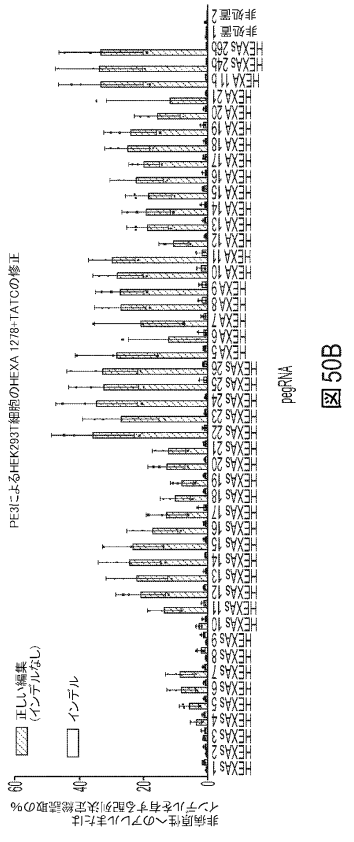


図50B

【図５１Ａ－Ｂ】

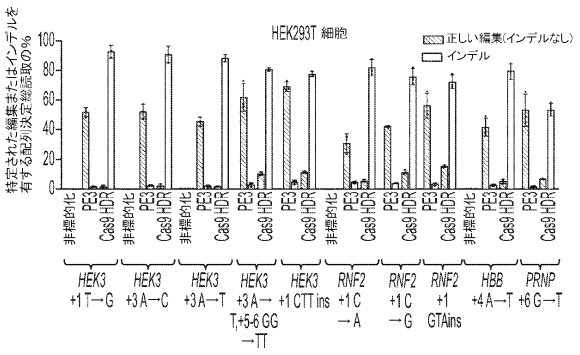


図 51A

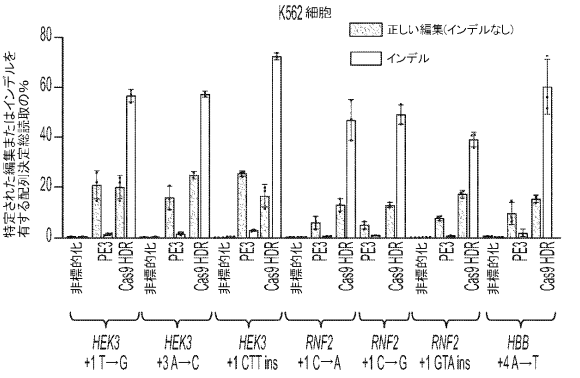


図 51B

【図５１Ｃ－Ｄ】

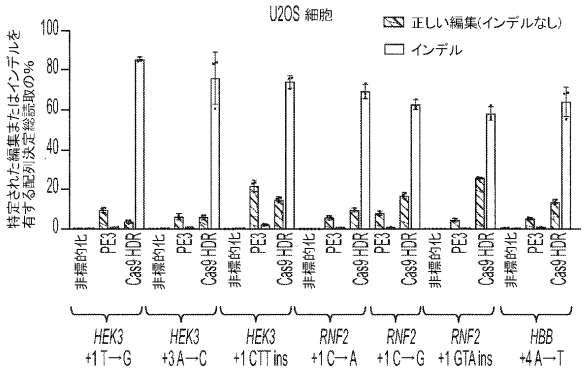


図 51C

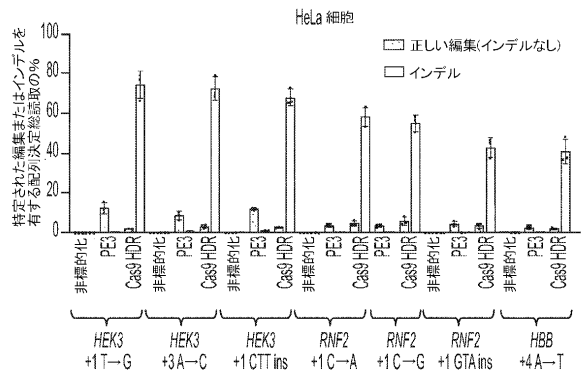


図 51D

【図５１Ｅ】

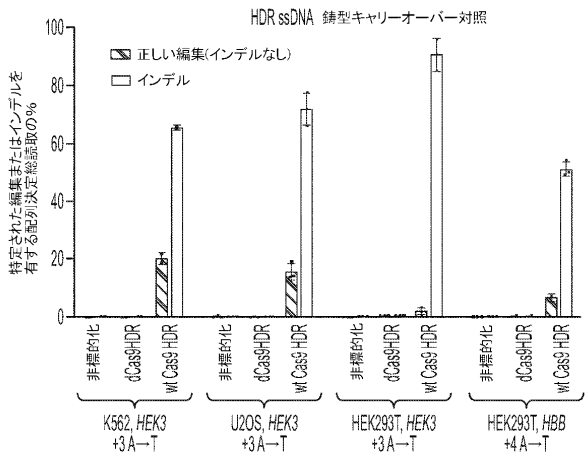


図 51E

【図５１Ｆ】

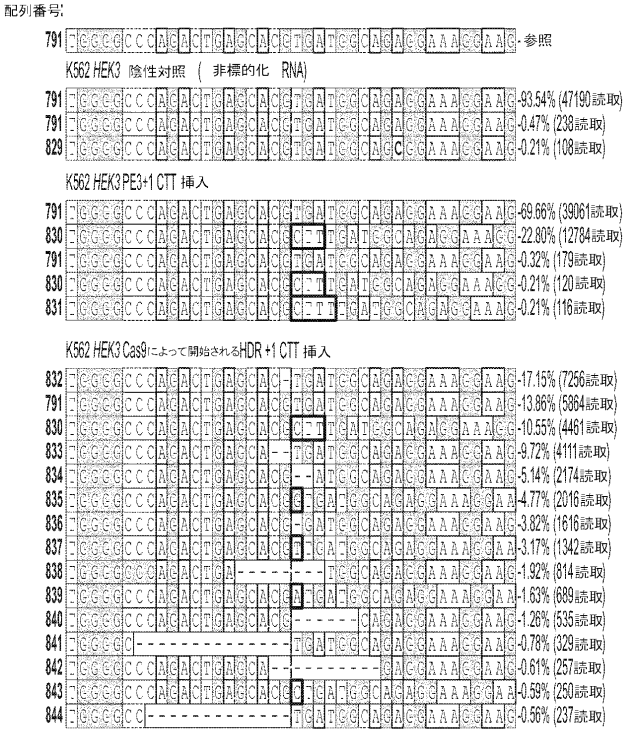


図 51F

【図５１Ｇ】

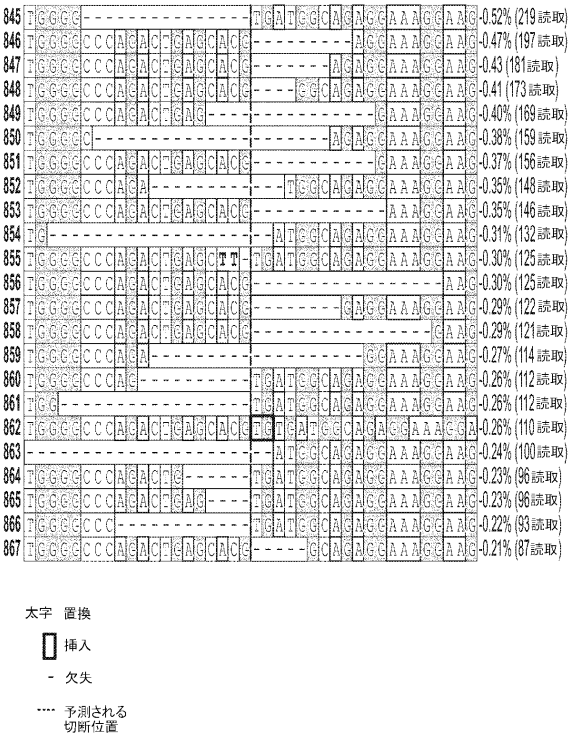


図 51G

【図５２Ａ－Ｂ】

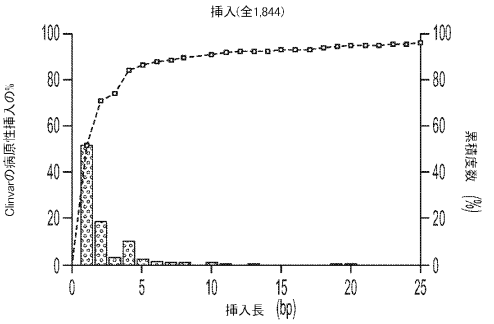


図 52A

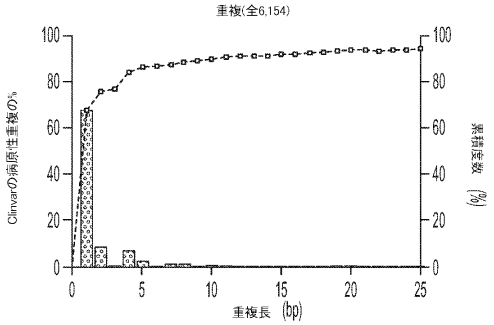


図 52B

【図５２Ｃ－Ｄ】

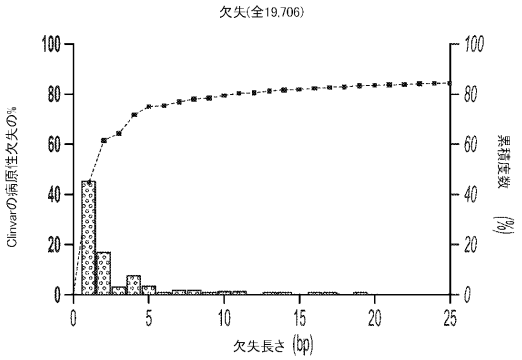


図 52C

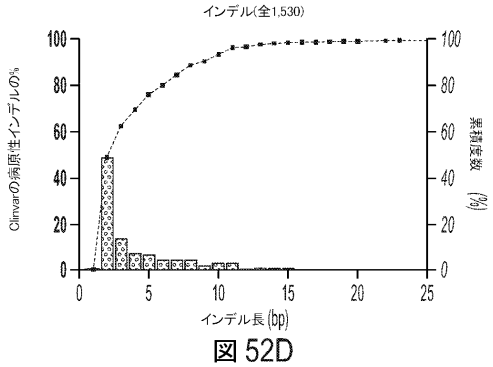
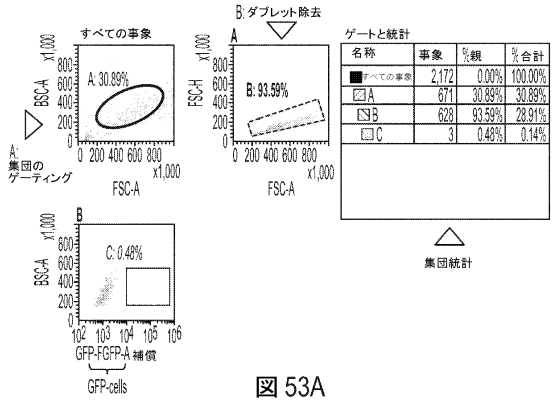


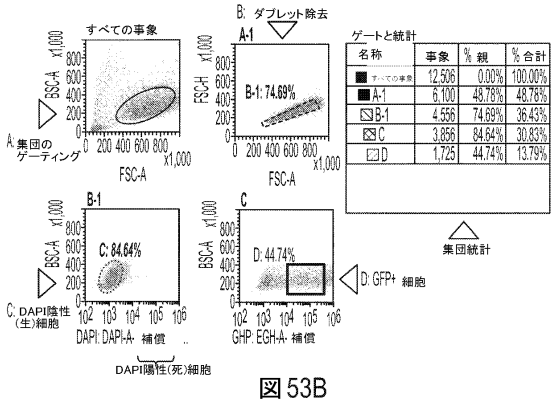
図 52D

【図５３Ａ－Ｂ】



名称	事象	%親	%合計
すべての事象	2,172	0.00%	100.00%
A	671	30.89%	30.89%
B	628	93.59%	28.91%
C	3	0.48%	0.14%

図 53A



名称	事象	% 親	% 合計
すべての事象	12,506	0.00%	100.00%
A-1	6,100	48.76%	48.76%
B-1	4,556	74.69%	36.43%
C	3,856	84.64%	30.83%
D	1,725	44.74%	13.79%

図 53B

【図５３Ｃ】

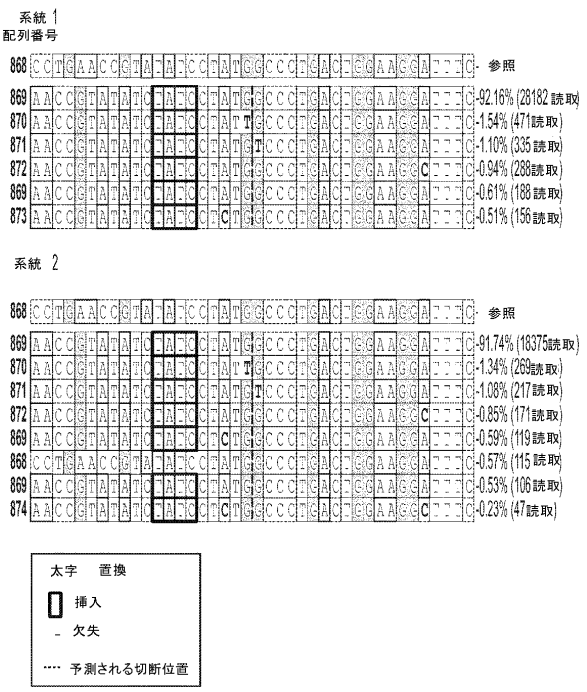


図 53C

【図５３Ｄ】

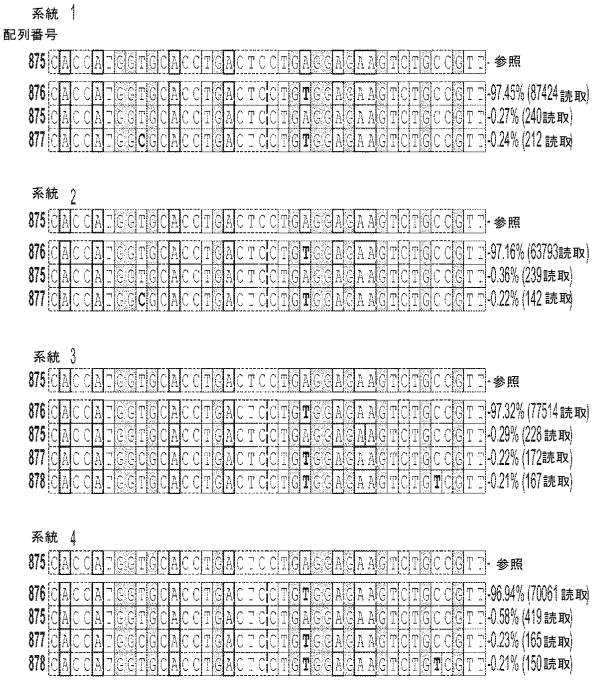


図 53D

【図５３Ｅ】

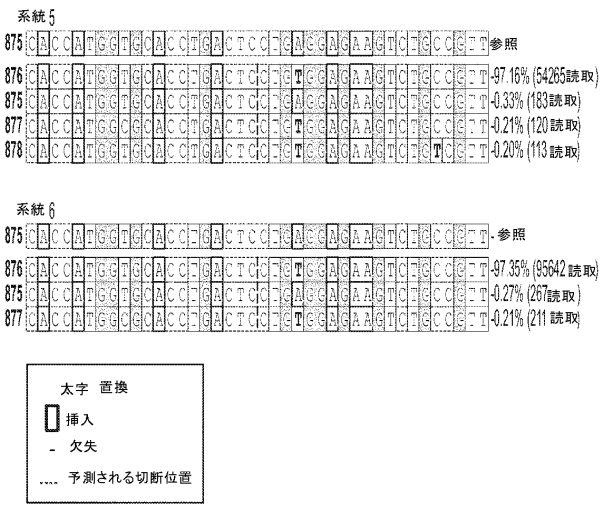


図 53E

【図５４】

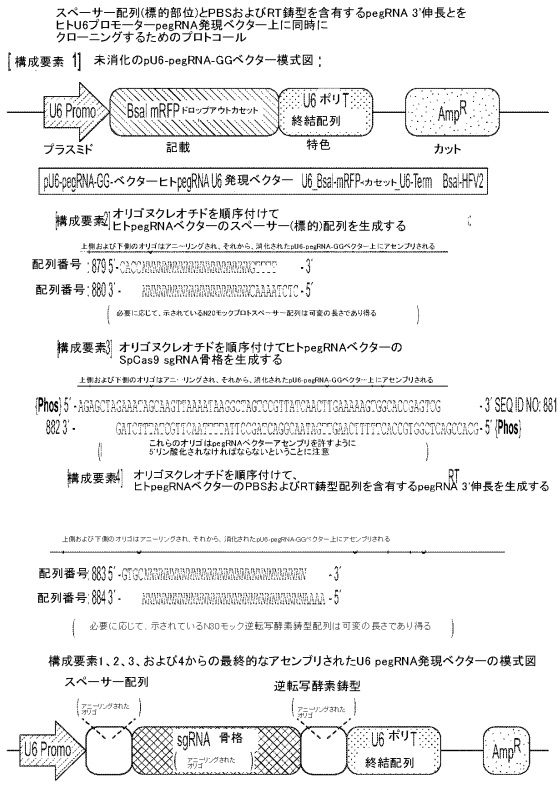


図 54

【図５５Ａ－Ｃ】

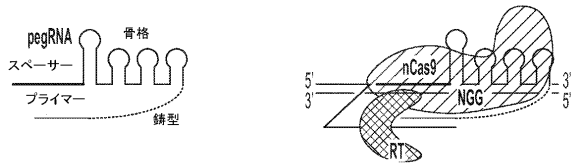


図 55A

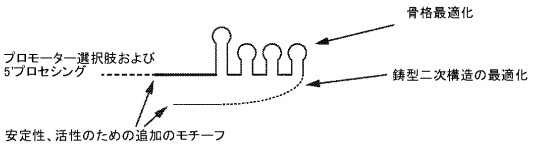


図 55B

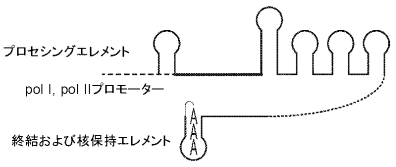


図 55C

【図５５Ｄ－Ｇ】

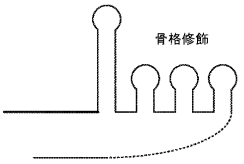


図 55D

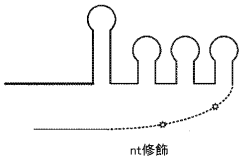


図 55E

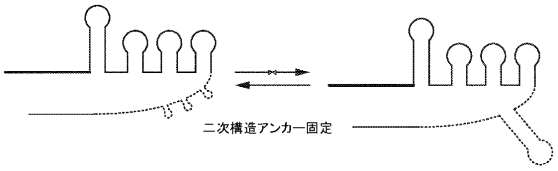


図 55F

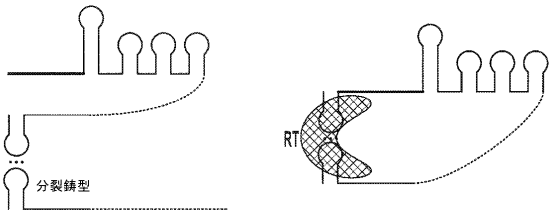


図 55G

【図５６Ａ】

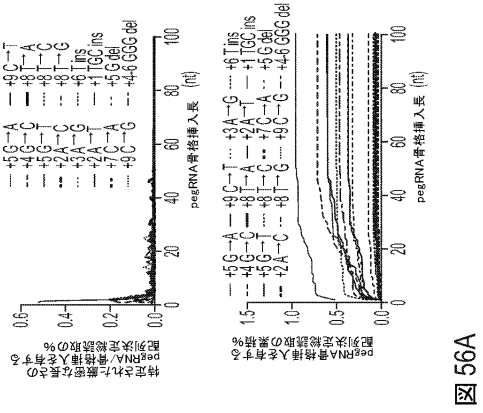


図 56A

【図５６Ｂ】

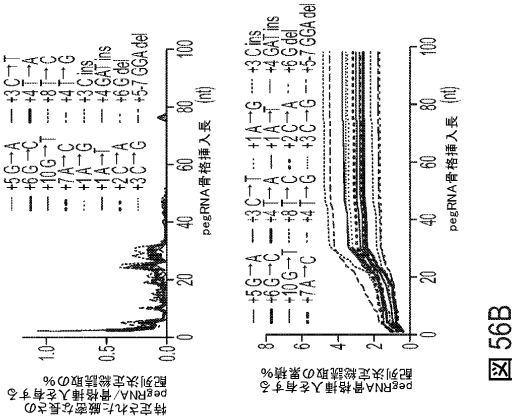


図 56B

【図５６Ｃ】

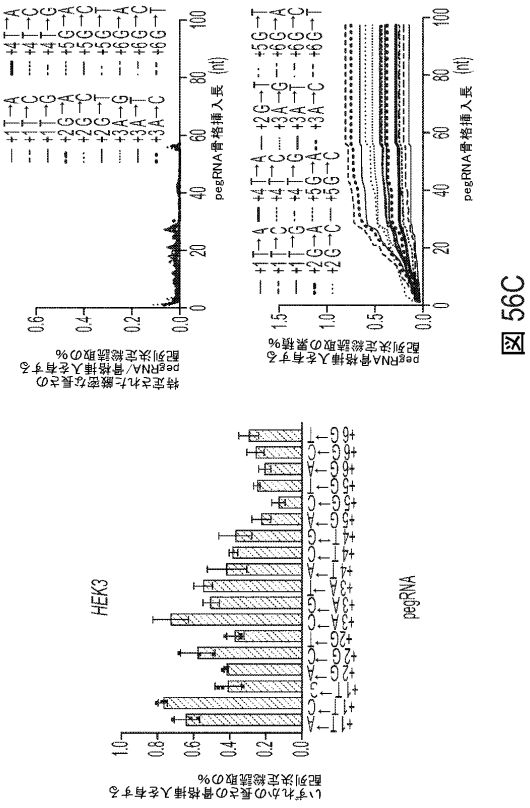


図 56C

【図５６Ｄ】

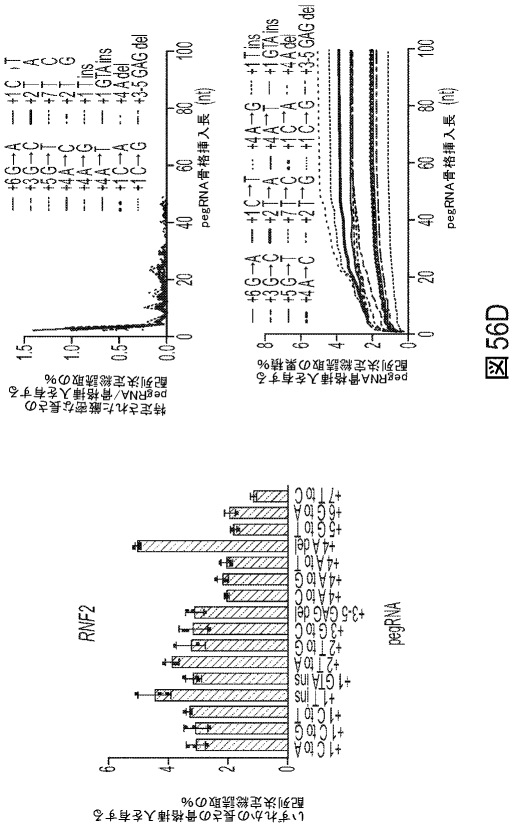


図 56D

【図５７Ａ】

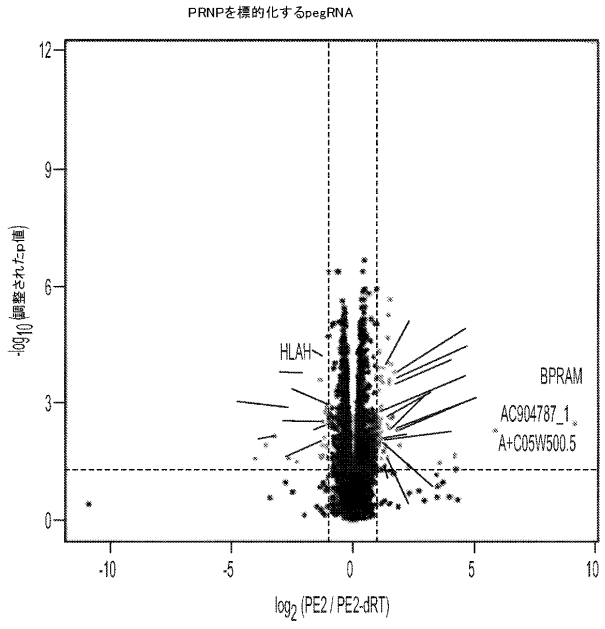


図 57A

【図５７Ｂ】

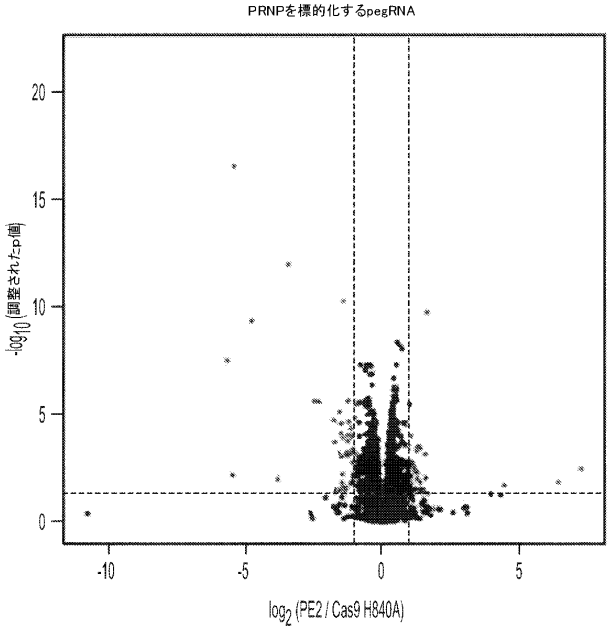


図 57B

【図５７Ｃ】

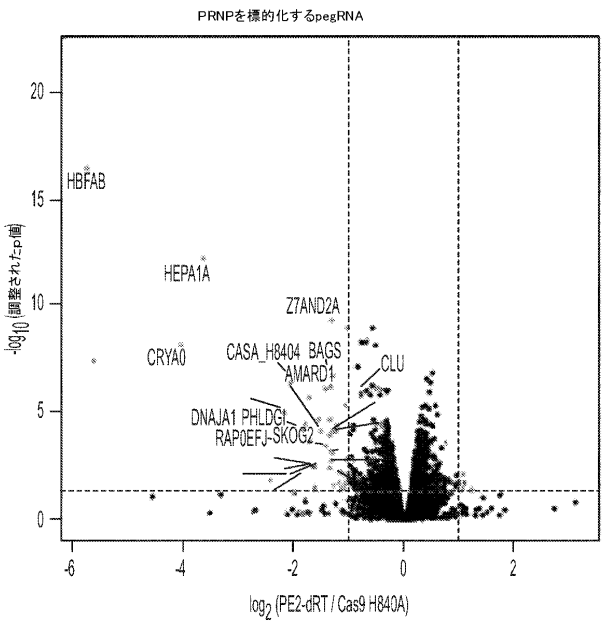


図 57C

【図５７Ｄ】

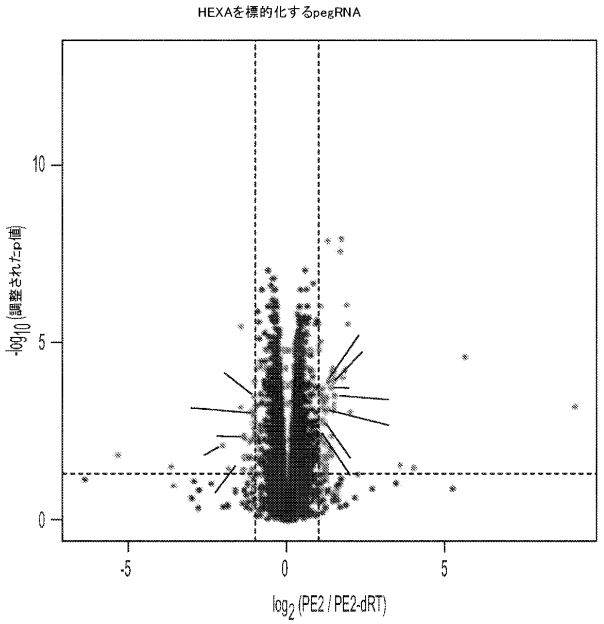


図 57D

【図５７Ｅ】

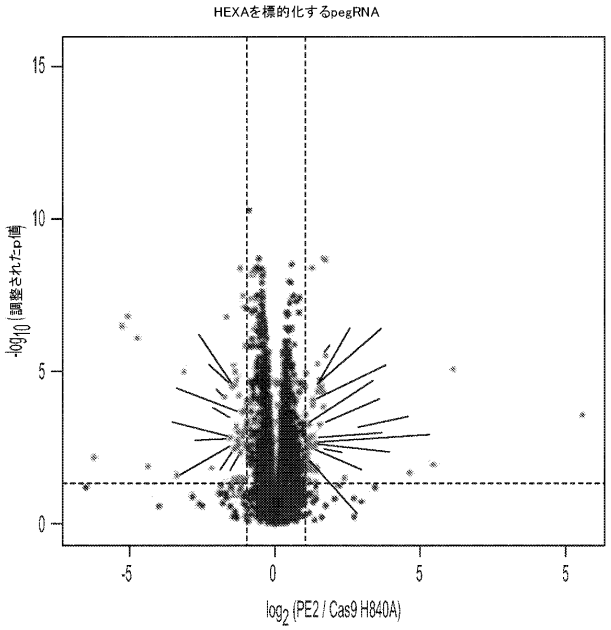


図 57E

【図５７Ｆ】

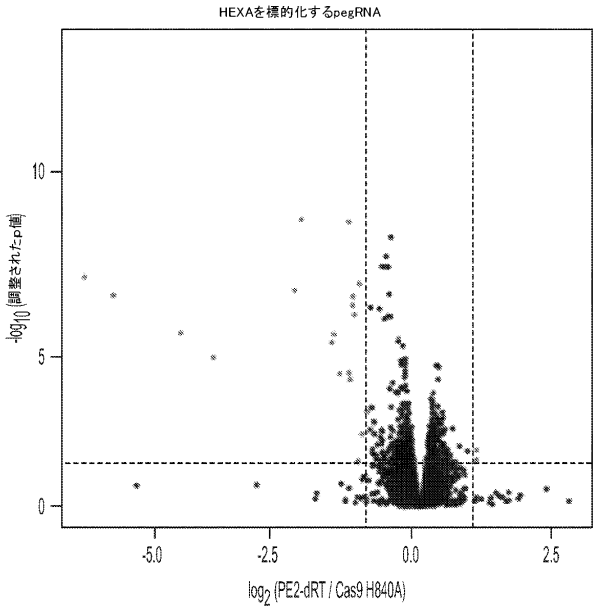


図 57F

【図５７Ｇ】

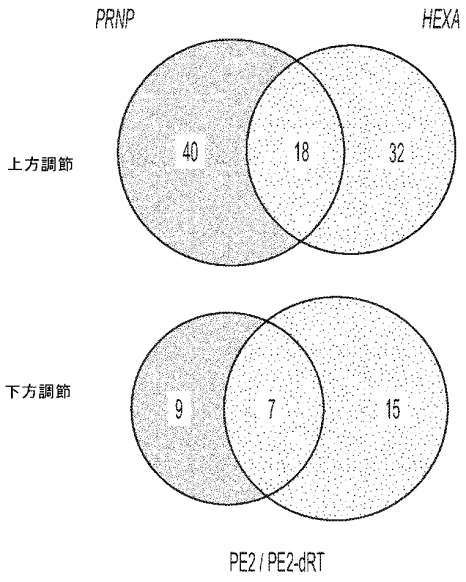


図 57G

【図５７Ｈ－Ｉ】

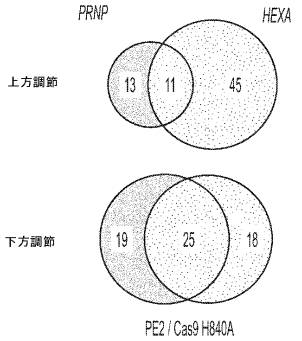


図 57H

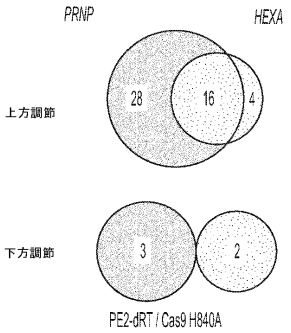


図 57I

【図５８Ａ】

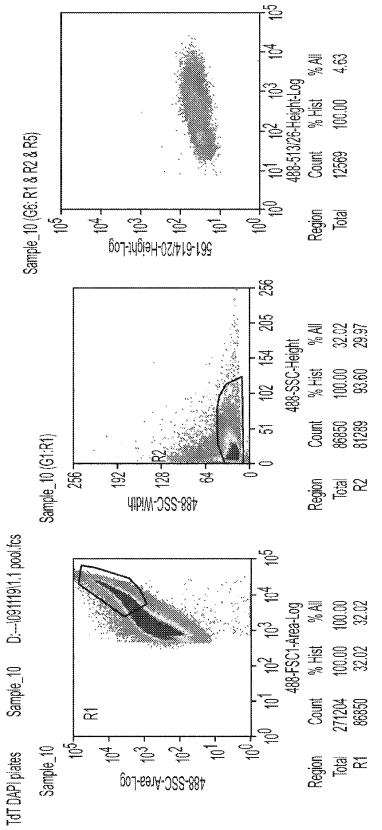


図 58A

【図５８Ｂ】

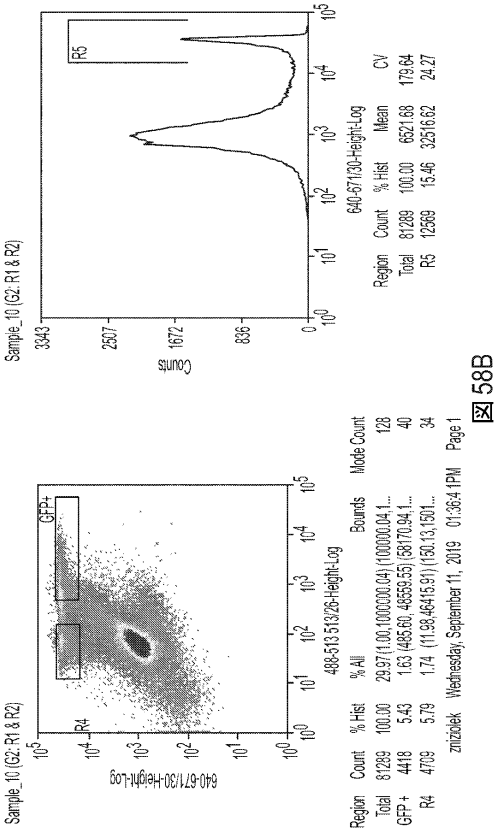


図 58B

【図５９Ａ－Ｂ】

クローニングの概観

1. pU6-pegRNA-GGベクタープラスミド(構成要素1)をBsaIによって消化し、
複製起点、U6プロモーター、U6ポリT終結配列、およびAmpR遺伝子を含有する
プラスミド断片(～2.2kb)を単離
2. オリゴヌクレオチドを順序付ける:
a. 指示されているオーバーハングによってフランキングされた
所望のスペーサー(標的)配列(構成要素2)
i. 所望の標的の5'-3'配列を上側の鎖のオリゴヌクレオチド
(5'CACCおよび3'GTTTTオーバーハングを包含する)に用い、
標的配列の逆相補物を下側の鎖の
オリゴヌクレオチド(5'CTCTAAAACオーバーハングを包含する)に用いる。
効率的な転写のためには、スペーサー配列はGヌクレオチドで始まらなければならない。
b. 指示されているオーバーハングによってフランキングされた
所望のpegRNA 3'伸長鋳型(構成要素3)
i. RNAセンス配列を上側の鎖の
オリゴヌクレオチド(5'GTGCオーバーハングをフィーチャとする)に用い、
この配列の逆相補物を下側の鎖のオリゴヌクレオチド
(5'AAAAオーバーハングをフィーチャとする)に用いる。
c. 適合性のゴールデンゲートオーバーハングをフィーチャとするSpCas9 sgRNA骨格配列(構成要素4)
i. 残りの構成要素からのオーバーハングがいくつかの欠けているヌクレオチドを寄与するので、
これらのオリゴヌクレオチドは完全な骨格配列ではない
ii. 注意、これらのオリゴヌクレオチドは5'リン酸化されなければならない
オリゴヌクレオチドは製造者によって5'リン酸化またはT4 PNKを用いて
酵素的に5'リン酸化され得る(下のプロトコールを見よ)
3. 下のプロトコールに従って、別個のアニーリング反応によって構成要素2、3、および4の
上側および下側のオリゴヌクレオチドをアニーリングする
SpCas9 sgRNA骨格配列(構成要素4)がリン酸化されなかった場合には、T4PNKによってリン酸化する。
4. 構成要素2、3、および4との構成要素1からの単離された2.2kb断片のゴールデンゲートアセンブリ
5. ライゲーション産物をE. coliに形質転換.
pU6-pegRNA-GGベクターからの構成要素1によって
付与される抗生物質耐性はアンピシリンおよびカルベニシリン耐性である。
6. もたらされるクローン性形質転換体からのプラスミドを単離および配列決定

図 59A

pegRNAクローニングプロトコール

ステップ1: pU6-pegRNA-GGベクタープラスミドを消化(構成要素1)
PCRチューブに次を組み合わせる:

2000 ng pU6-pegRNA-GGベクター(構成要素1)	X μL
Bsa1-HFv2 (NEB)	1.0 μL
10x Cutsmart緩衝液	3.0 μL
H_2O	30.0 μLに
反応総体積	30.0 μL

37?Cで4～16時間に渡ってインキュベーション
カットされたプラスミドから～2.2kb断片を単離

図 59B

【図５９Ｃ－Ｄ】

ステップ2および3: オリゴヌクレオチドパーツを順序付けおよびアニーリング(構成要素2、3、および4)

材料

アニーリング緩衝液:
10mM Tris-Cl pH8.5および50mM NaClを足されたH2O
相補的なオリゴヌクレオチドペア

プロトコール
PCRチューブに次を組み合わせる:

上側のオリゴヌクレオチド, 100 μM	1.0 μL
下側のオリゴヌクレオチド 100 μM	1.0 μL
アニーリング緩衝液(構成要素2、3、および4)	23.0 μL
反応総体積	25.0 μL

サーモサイクラーによって95℃にて3分間加熱、それから徐々に22℃まで冷却(0.1?C/s)

5μL H2Oを追加することによって、アニーリングされたオリゴヌクレオチドを1:4希釈。
各オリゴヌクレオチドの終濃度はこの希釈後に1μMであろう。
ステップ2.5でPNKによってリン酸化する場合には、sgRNA骨格(構成要素4)は希釈しない。

図 59C

ステップ2.b.ii.: sgRNA骨格リン酸化(オリゴヌクレオチドがリン酸化されて購入される場合には不必要)

プロトコール
PCRチューブに次を組み合わせる:

ステップ1からの4μMオリゴヌクレオチド二重鎖	6.25 μL
10x T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)	2.50 μL
T4 PNK (NEB)	0.50 μL
H_2O	15.75 μL
反応総体積	20.0 μL

サーモサイクラーによって37℃にて60分間インキュベーション
このリン酸化後に、アニーリングされた骨格オリゴヌクレオチドはここで1μMの濃度である。
ステップ3に進む.

図 59D

【図５９Ｅ－Ｆ】

ステップ4: pegRNAアセンブリ

pegRNAゴールデンゲートアセンブリ反応

消化されたpU6-pegRNA-GGプラスミドベクター 予めカットされた単離された2.2kb断片	1.00 μL @ 30 ng/μL
アニーリングされたプロトスペーサーオリゴヌクレオチド(構成要素2)	1.00 μL @ 1 μM
アニーリングされたpegRNA 3'伸長オリゴヌクレオチド(構成要素4)	1.00 μL @ 1 μM
sgRNA骨格のアニーリングされたオリゴヌクレオチド(構成要素3) オリゴヌクレオチドはリン酸化されなければならない	1.00 μL @ 1 μM
*Bsa*I-HFv2 (NEB)	0.25 μL
T4 DNAリガーゼ(NEB)	0.50 μL
10x T4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)	1.00 μL
H_2O	4.25 μL
反応総体積	10.0 μL

室温にて10minインキュベート
インキュベーション後に、サーモサイクラーで次のプログラムを行う。
37℃にて5min、次いで80℃にて5min、次いで12℃にて保持

図 59E

ステップ5および6: アセンブリされたプラスミドの形質転換

10μLアセンブリ反応の1μLを10μLのコンピテントセルに
形質転換。所望の形質転換体はアンピシリンおよびカルベニシリンに耐性であろう。

次のダイアグラムはpegRNAクローニングプロトコールをまとめている。

図 59F

【図５９Ｇ】

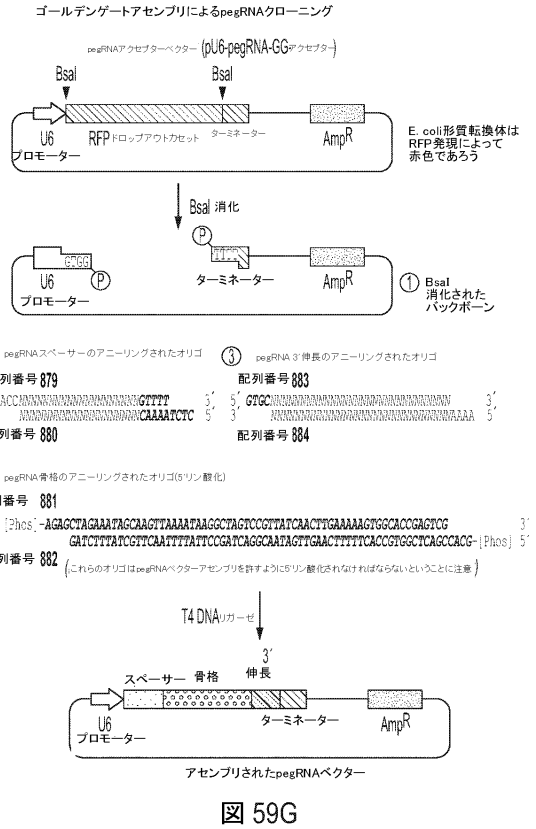


図 59G

【図６０Ａ】

```
## sgRNA scaffold sequence search ##

import pandas as pd
import Bio as bio
from Bio import SeqIO
import glob

#generates list of fastq files to analyze
sources = glob.glob('*.fastq')

#reads the fastq files into a dictionary with the file names as keys
fastqdict = {}
for i in range(len(sources)):
        temp = list(SeqIO.parse(source[i],"fastq"))
        fastqdict[sources[i]]= [str(temp[k].seq) for k in range(len(temp))]

#the referenced sequence to be searched for is entered into the following dictionary with
#an appropriate key
scaffdict =
{'HEK3':'CACAGGACCGACTCGGTCCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTT
GCTATTTCTAGCTCTAAAACTCACGTGCTCAGTCTGGGCCGGTG',(SEQ ID NO: 885)
'EMX1':'ATCACGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACT
TGCTATTTCTAGCTCTAAAACTTCTTCTTCTGCTCGGACTCGGTG',(SEQ ID NO: 886)
'FANCF':'TTTCCGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAAC
TTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGGTGCTGCAGAAGGGATTCCGGTC',(SEQ ID NO: 887)
'RNF2':'TCGTTGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTT
GCTATTTCTAGCTCTAAAACCAGGTAATGACTAAGATGACGGTG'} (SEQ ID NO: 888)

#matches and counts iterative slices of the reference string to the appropriate fastq files
#reference key must be contained in the name of the fastq file
#generated values represent cumulative counts for a minimum degree of sgRNA integration
#i.e. a given value x means x reads contain y or more bases of the scaffold
resultcdict = dict.fromkeys(sources)
for key in fastqdict:
    for scaffold in scaffdict:
        if scaffold in str(key):
            resultlist = []
            for j in range(len(scaffdict[scaffold])):
```

図 60A

【図６０Ｂ】

```
                extent = scaffdict[scaffold][0:(j+1)]
                counter = 0
                for i in range(len(fastqdict[key])):
                    if extent in fastqdict[key][i]:
                        counter = counter + 1
                resultlist.append(counter)
            resultdict[key]=resultlist

#writes the results into a dataframe indexed from 1
resultcf = pd.DataFrame.from_dict(resultdict)
resultcf = resultcf.reindex(sorted(resultcf.columns), axis=1)
resultcf.index = range(1,len(resultcf)+1)

#converts the cumulative count values into specific counts
#i.e. a given value x means x reads contain exactly y bases of the scaffold
resultcf2=resultcf.copy()
for entry in resultcf:
    for i in range(1,len(resultcf[entry])+1):
        try:
            resultcf2[entry][i] = resultcf[entry][i]-resultcf[entry][i+1]
        except:
            resultcf2[entry][i] = resultcf[entry][i]

#converts the specific counts values into frequencies
resultcf3=resultcf2.copy()
for entry in resultcf3:
    resultcf3[entry]=resultcf2[entry].div(resultcf[entry][1])*100

#reads the results into excel files
resultcf.to_excel('cumulativecounts.xlsx')
resultcf2.to_excel('specificcounts.xlsx')
resultcf3.to_excel('specificfrequencies.xlsx')
```

図 60B

【図６１】

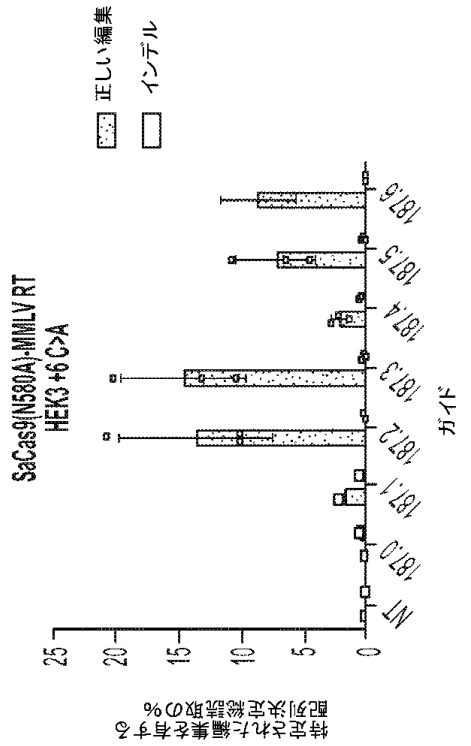


図 61

【図６２Ａ】

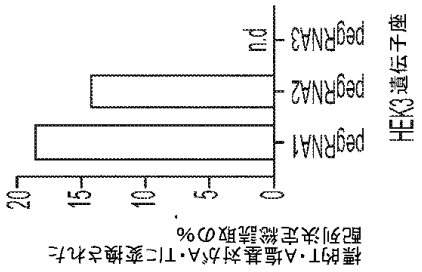


図 62A

【図６２Ｂ】

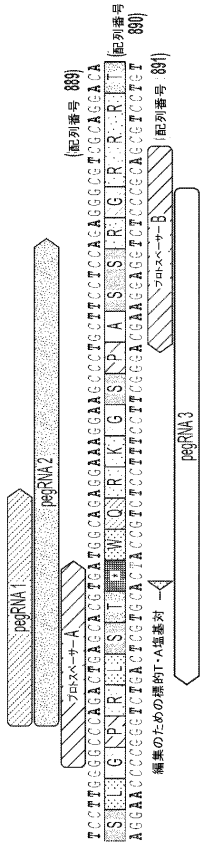


図 62B

【図６３】

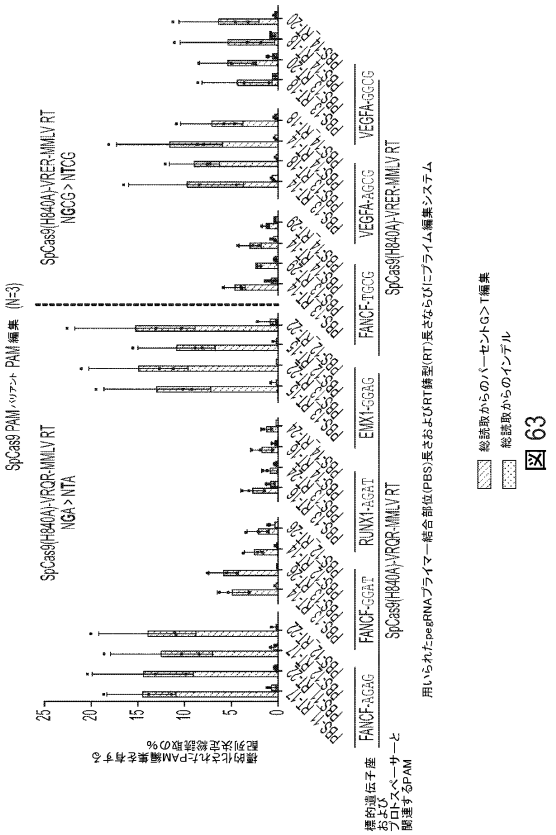


図 63

【図６４】

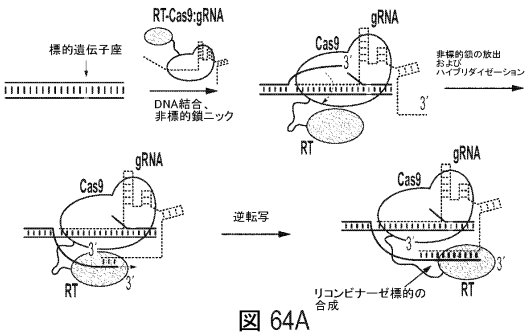


図 64A

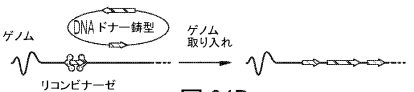


図 64B

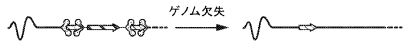


図 64C

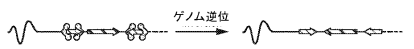


図 64D

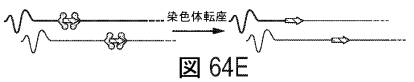


図 64E

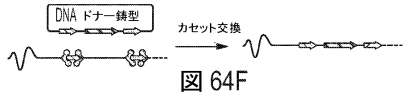


図 64F

【図６５】

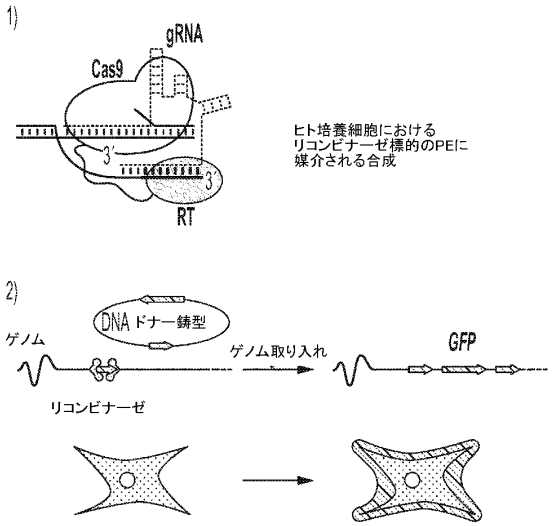


図 65

【図６６】

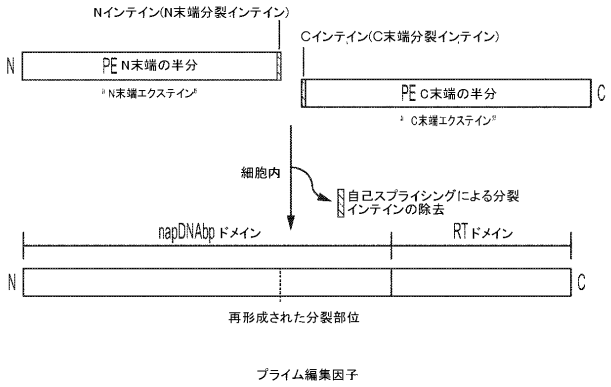


図 66

【図６７Ａ】

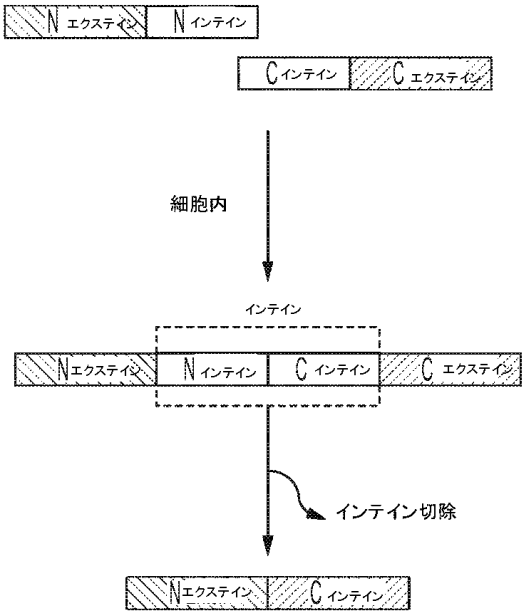


図 67A

【図６７Ｂ】

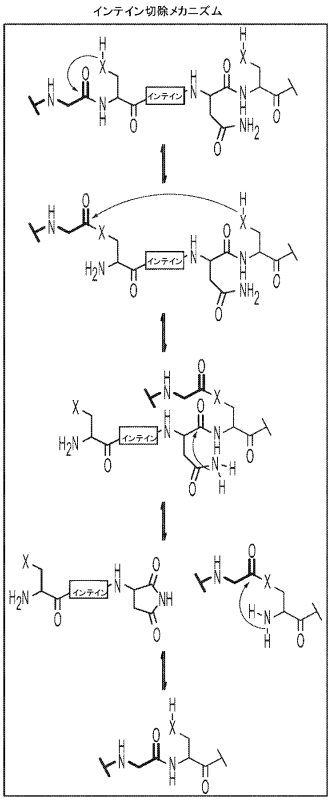


図 67B

【図６８Ａ－Ｂ】

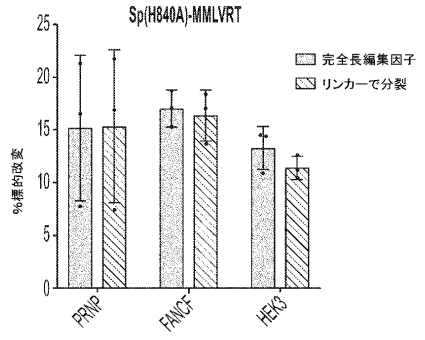


図 68A

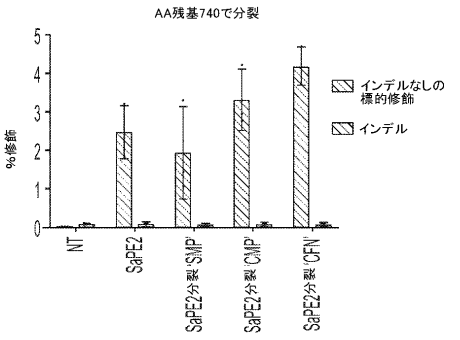


図 68B

【図６８Ｃ】

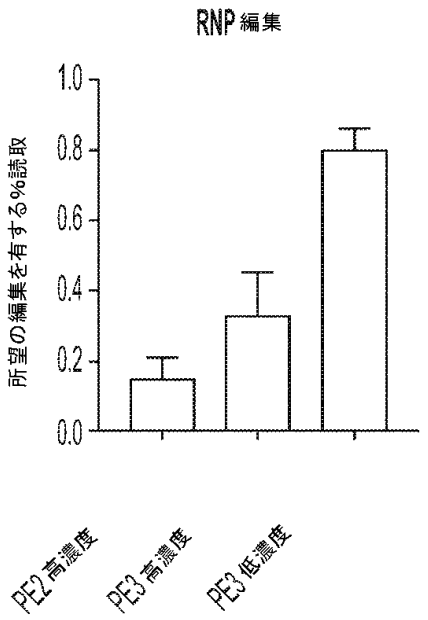


図 68C

【図６９】

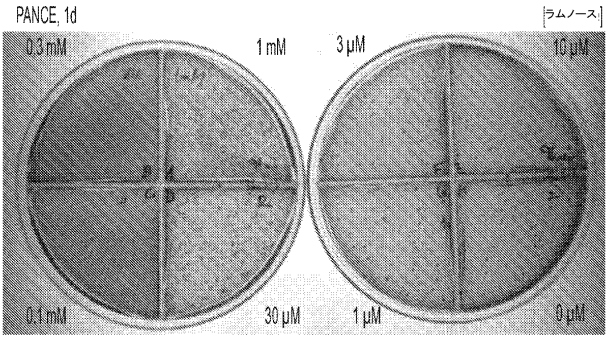


図 69

【図７０Ａ－Ｃ】

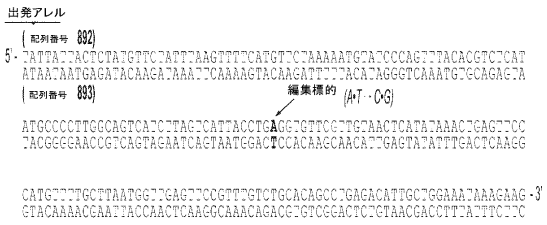


図 70A



図 70B

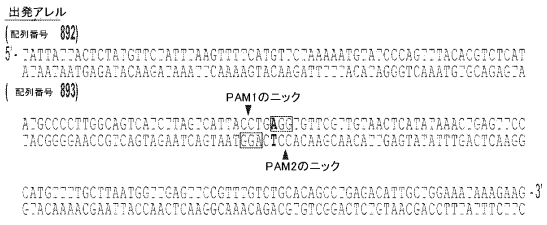


図 70C

【図７０Ｄ－Ｆ】

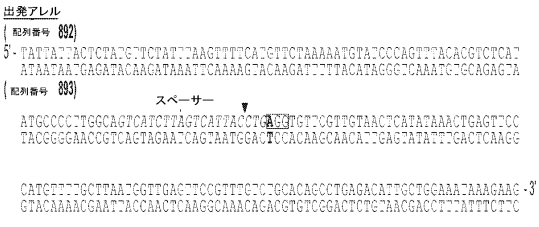


図 70D

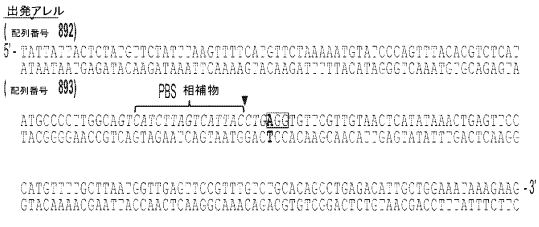


図 70E

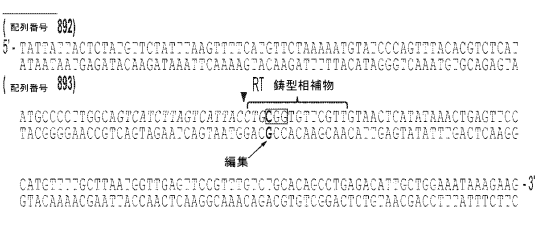


図 70F

【図７０Ｇ－Ｉ】

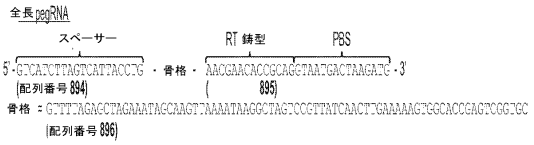


図 70G

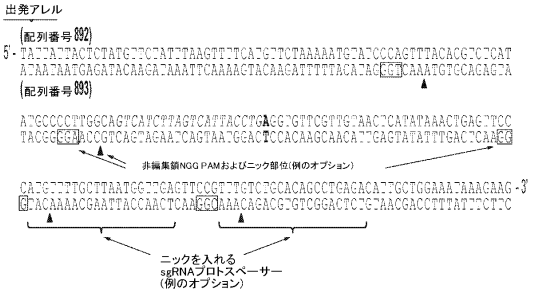


図 70H

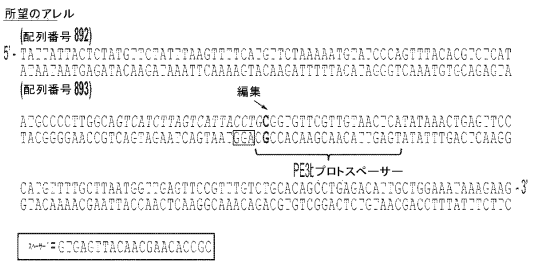


図 70I

【図７１】

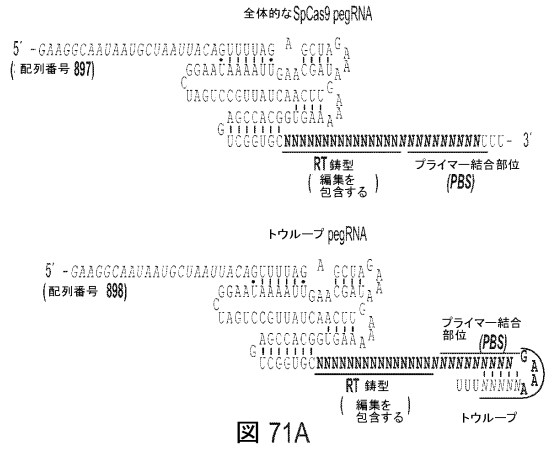


図 71A

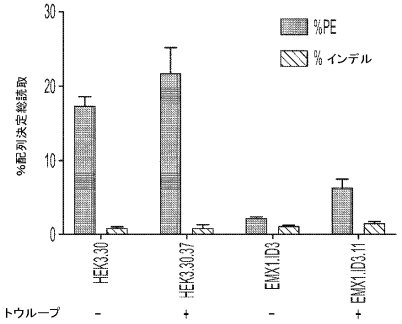


図 71B

【図７２Ａ－Ｂ】

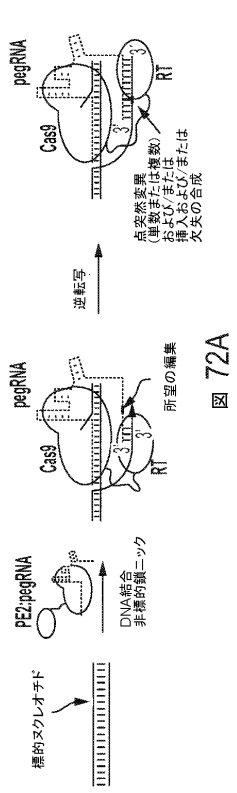


図 72A

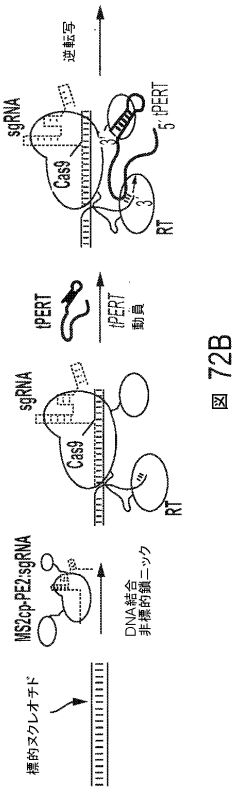


図 72B

【図７２Ｃ】

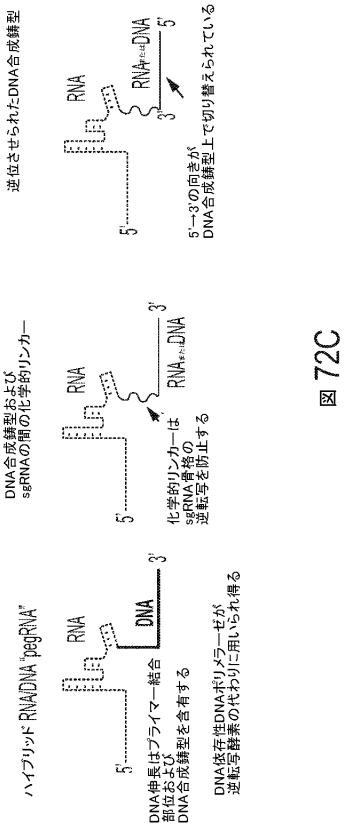


図 72C

【図７３】

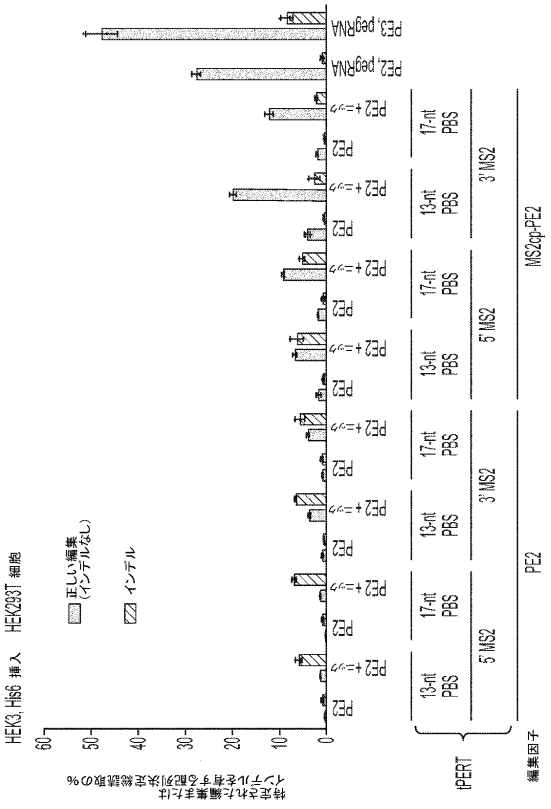


図 73

【図７４】

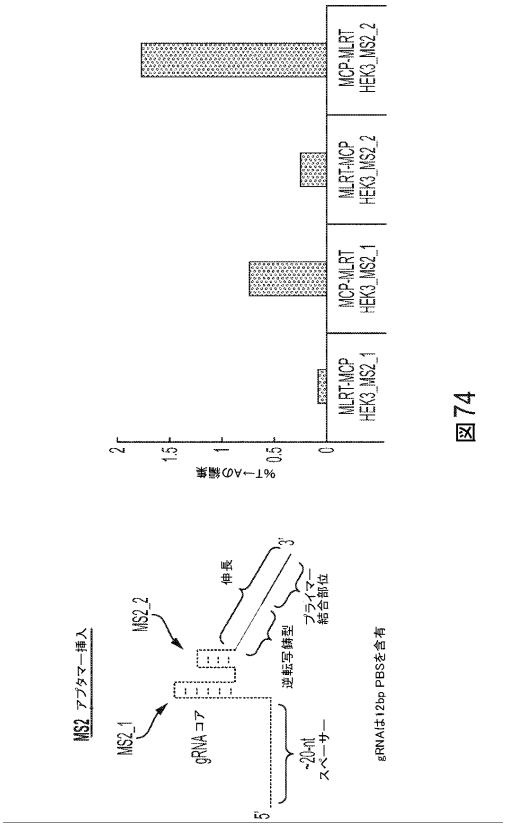


図 74

【図７５】

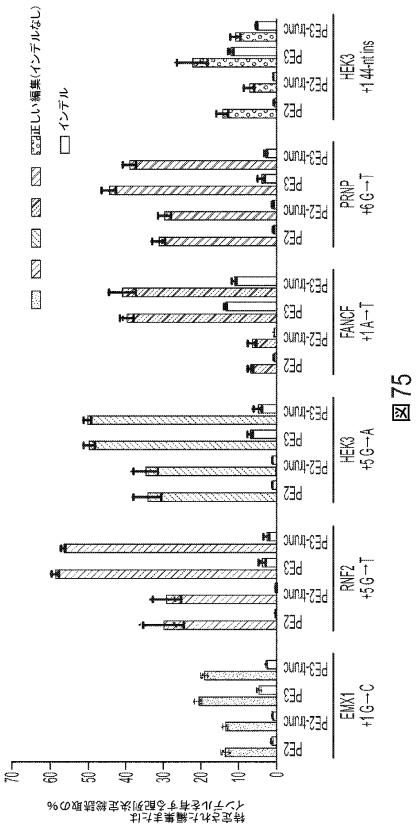


図 75

【図７６】

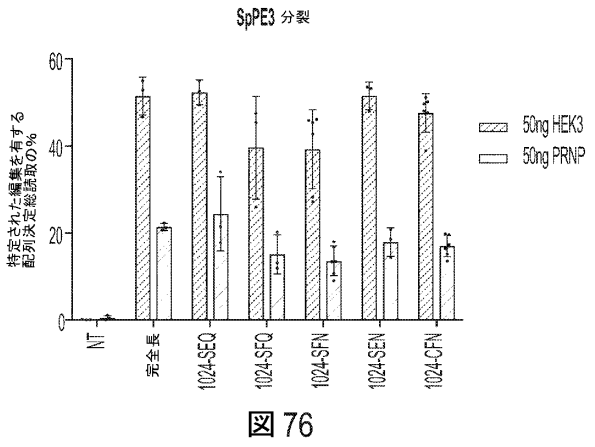


図 76

【図７７】

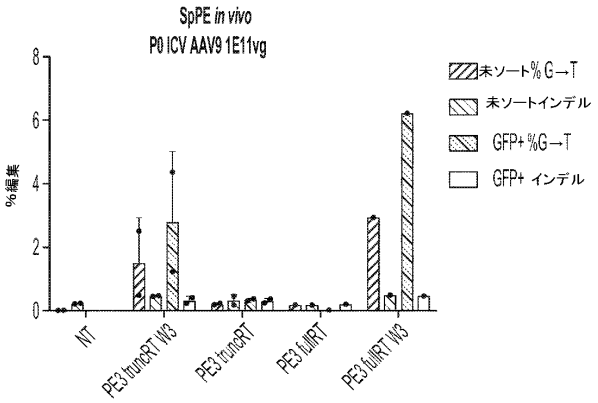


図 77

【図７８】

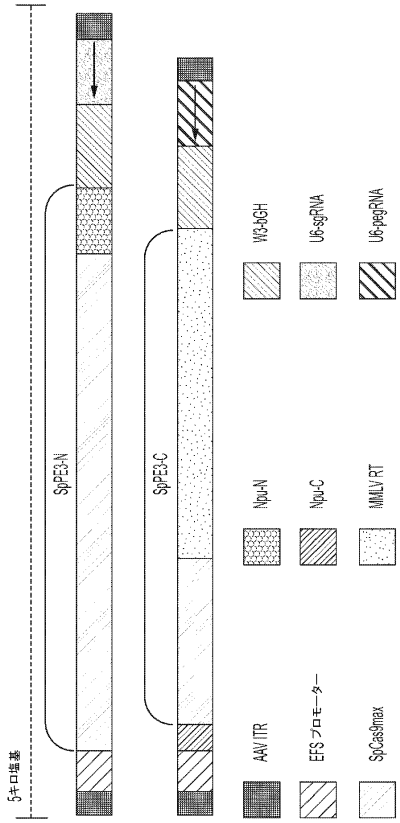


図 78

【図７９】

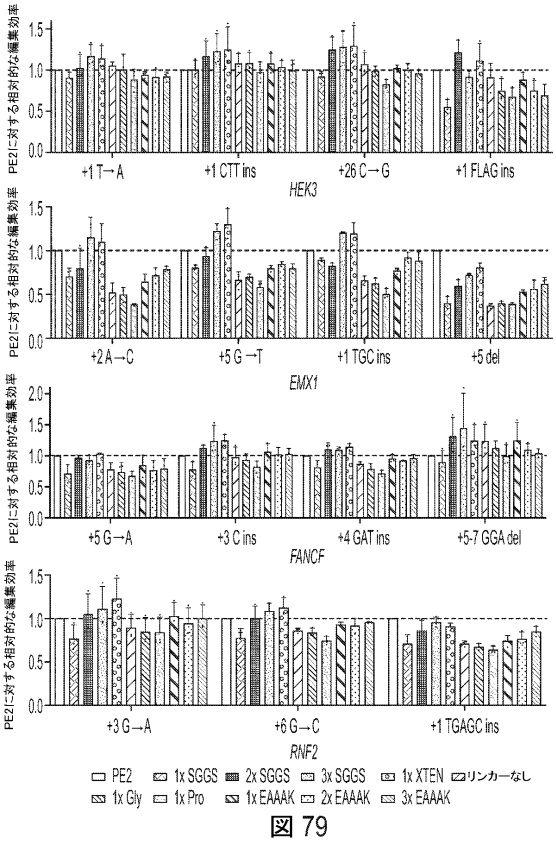


図 79

【図８０】

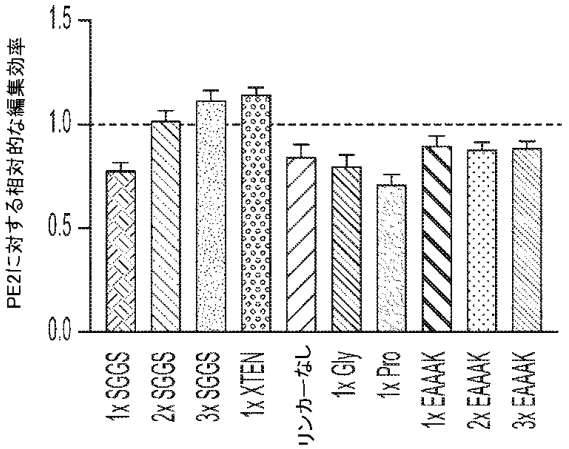


図 80

【図８１】

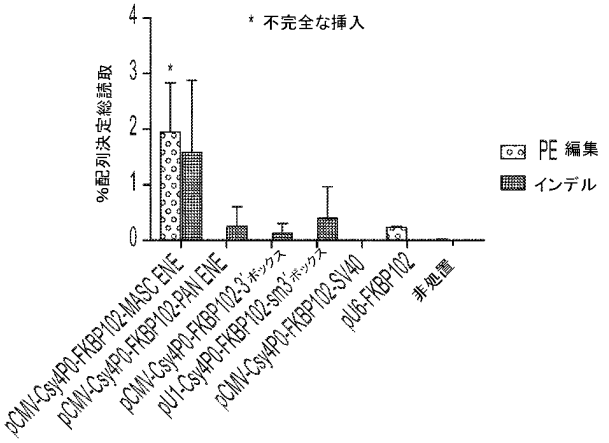


図 81

【図８２】

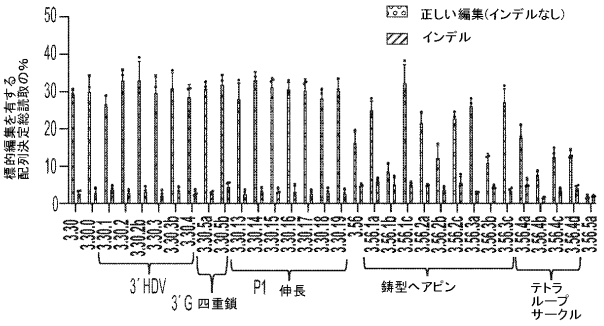


図 82

【図８３】

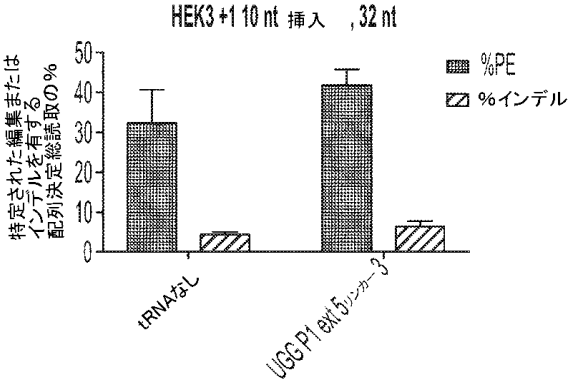


図 83

【図８４】

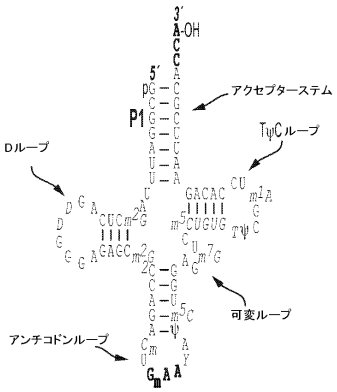


図 84A

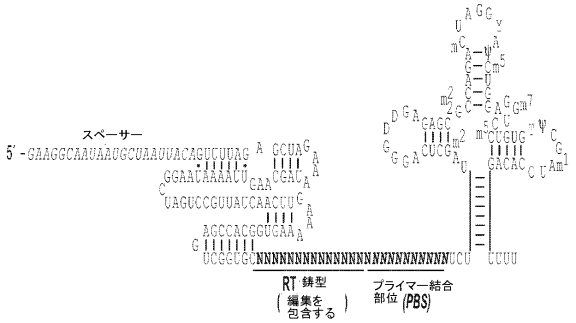


図 84B

【図８５】

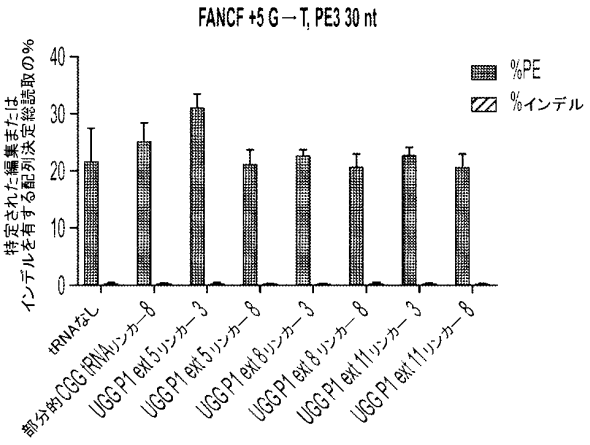


図 85

【図８６】

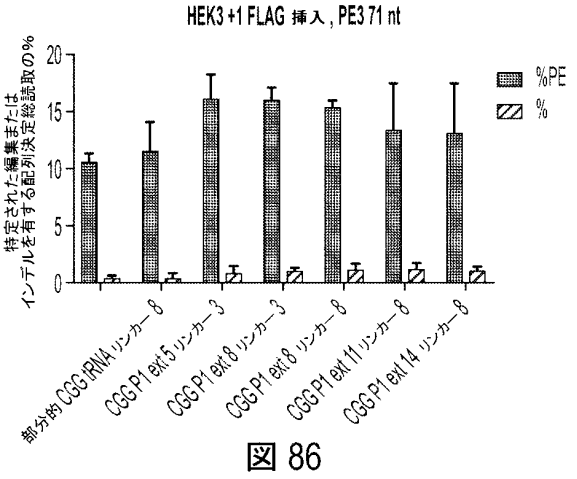


図 86

【図８７】

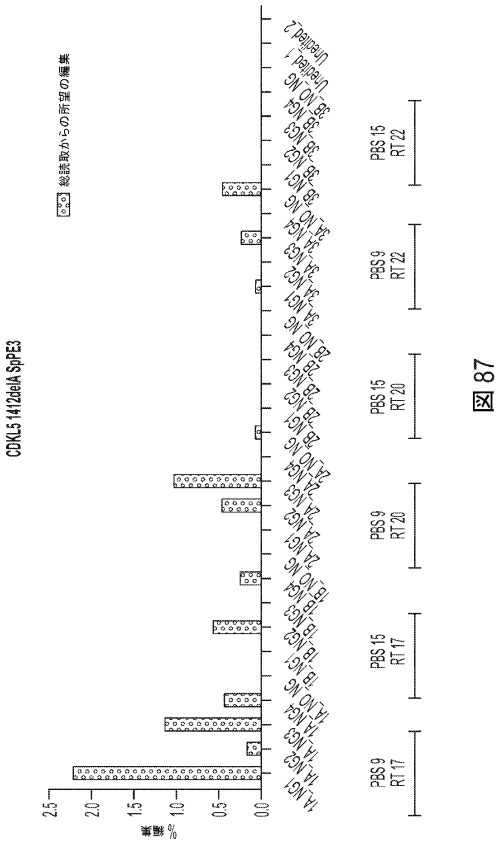


図 87

【図８８】

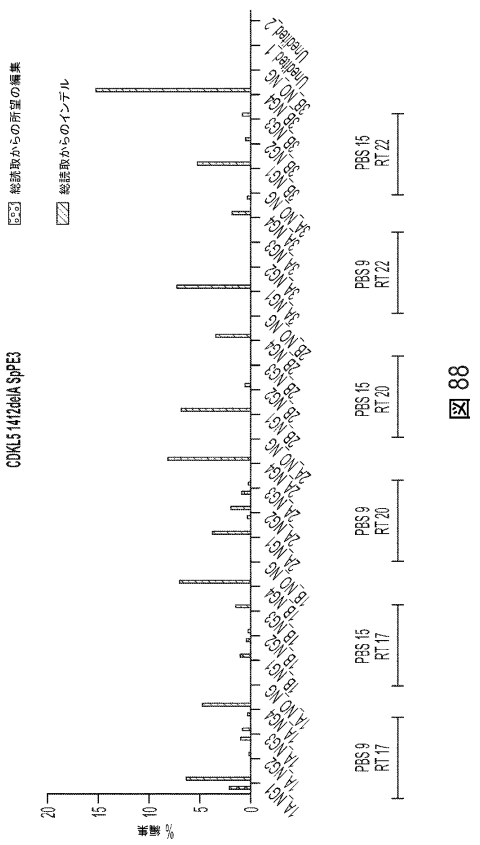


図 88

【図８９】

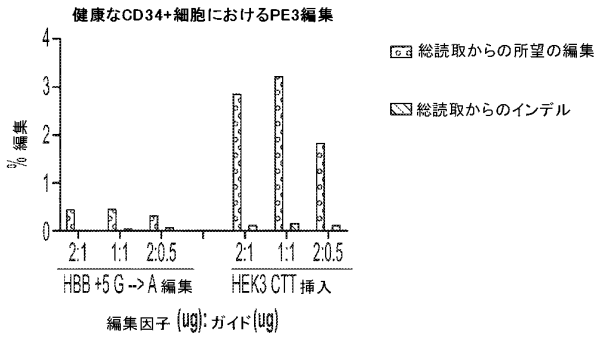


図 89

【図９０】

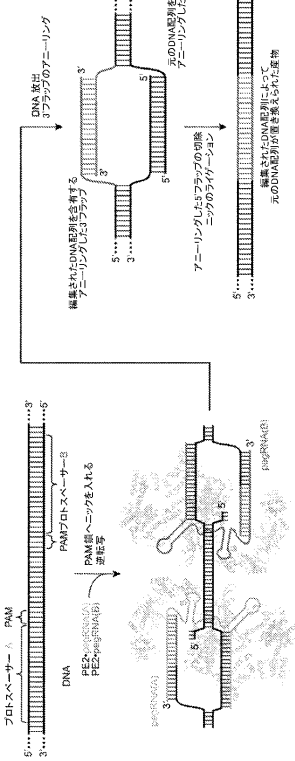


図 90

【図９１】

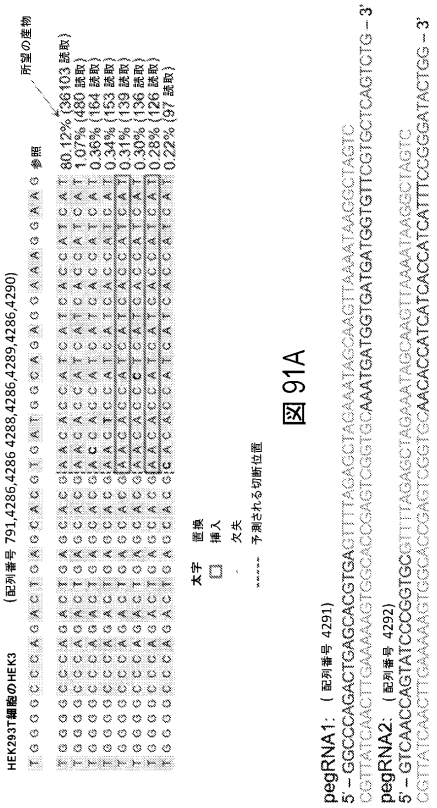


図 91A

pegRNA1: (配列番号 4291)
5' – GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAAATGATGGTGTTCGTCGCTCAGTCTG – 3'
pegRNA2: (配列番号 4292)
5' – GTCAACCAGTATCCCGGTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAACACCATCATCACCATCATTTCCGGGATACTGG – 3'

図 91B

【図９２】

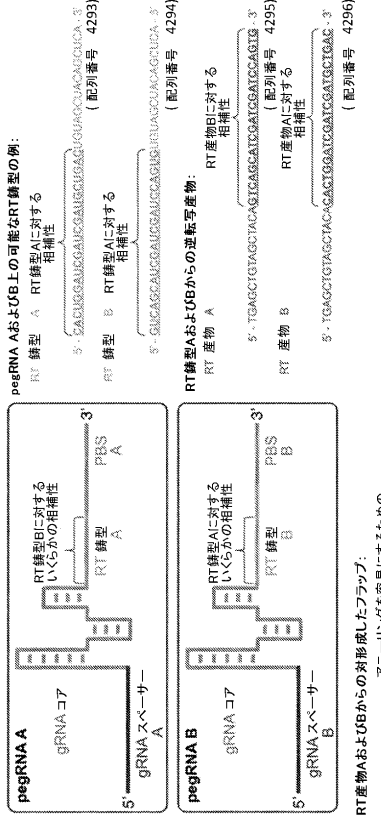


図 92

【図９３Ａ】

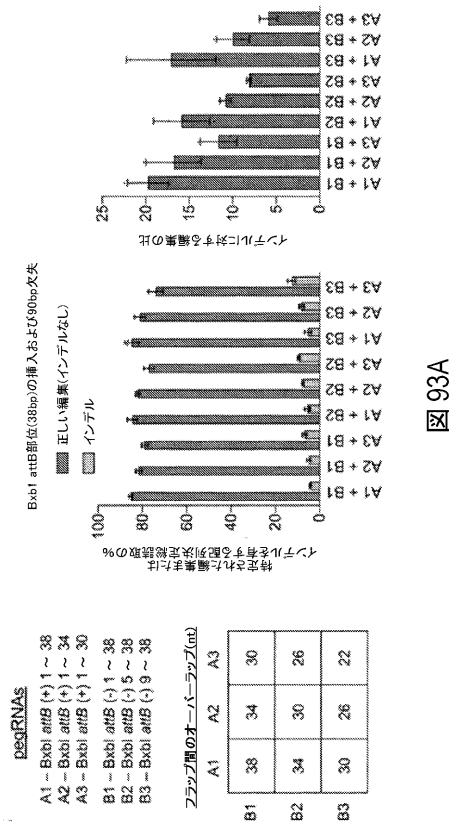


図 93A

【図９３Ｂ】

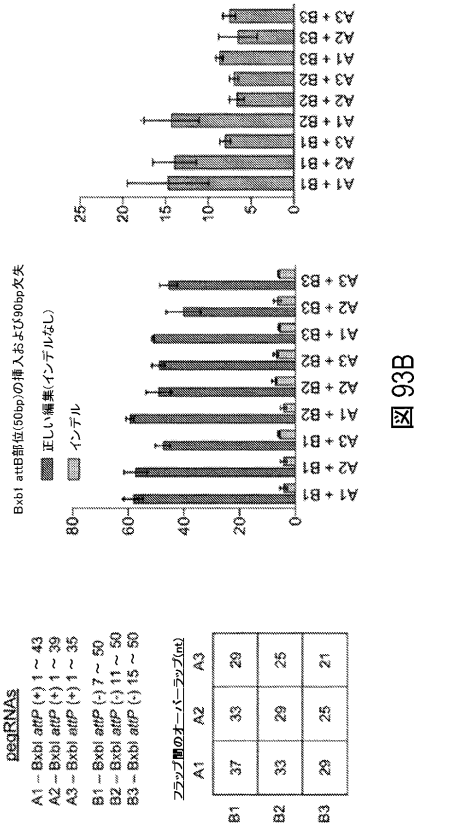


図 93B

【図９４】

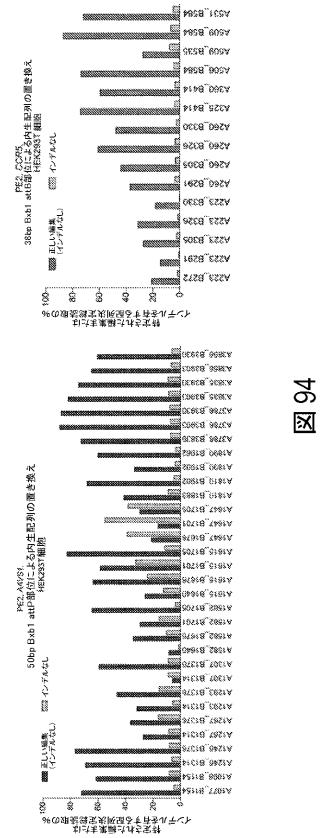


図 94

【図９５】

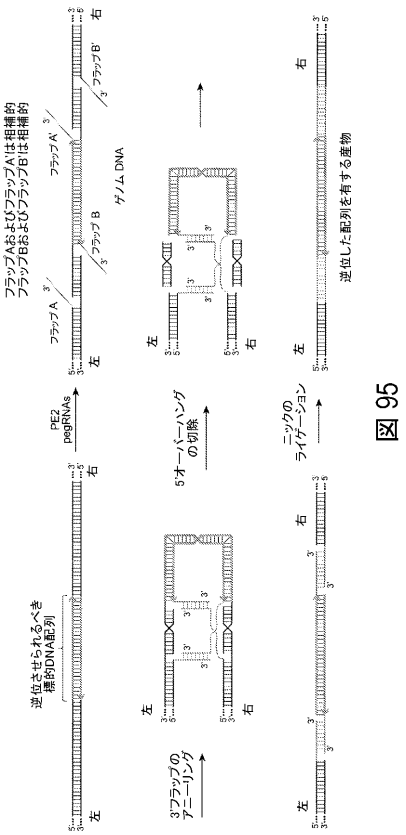


図 95

【図９６】



図96

【図９７Ａ】

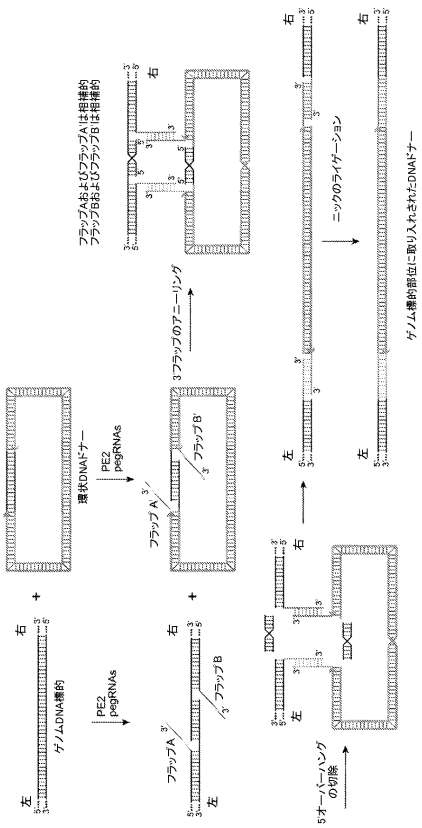


図97A

【図９７Ｂ】

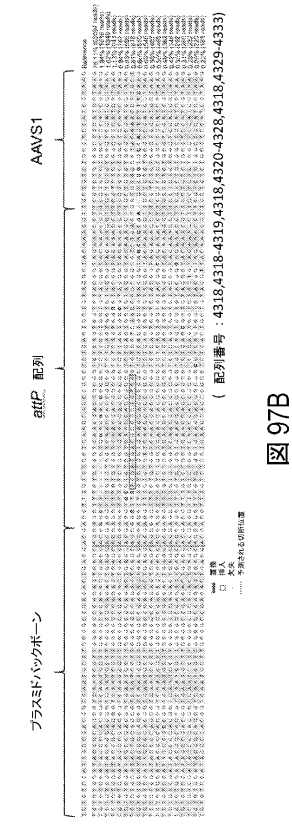


図97B

【図９８Ａ】

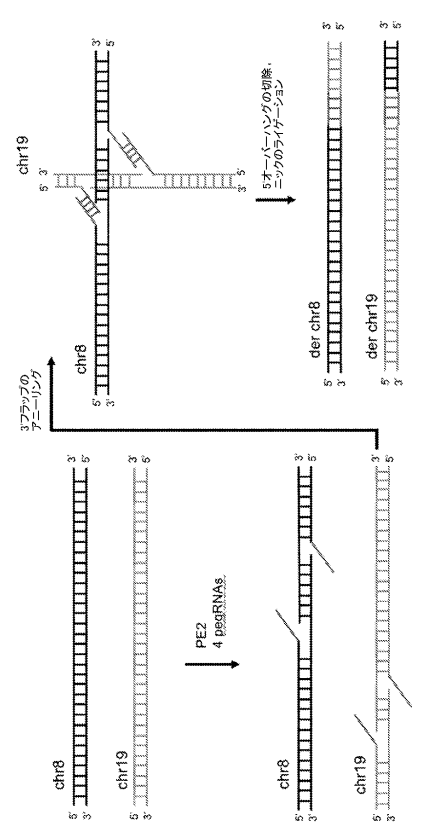


図98A

【図９８Ｂ】

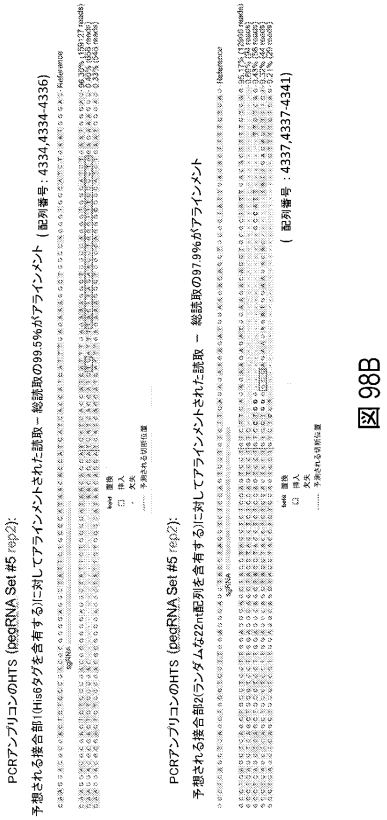


図 98B

【図９９】

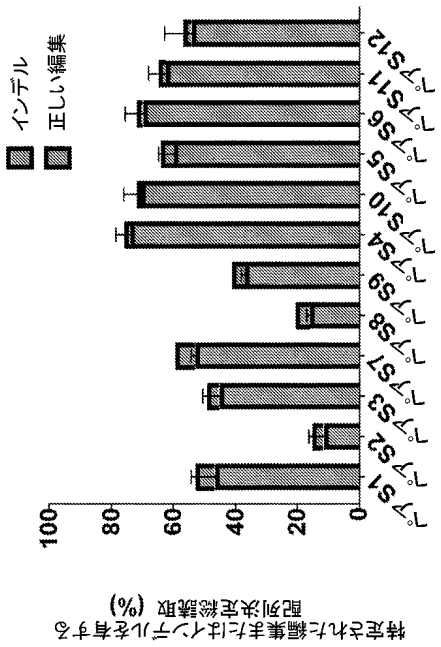


図 99

【図１００Ａ】

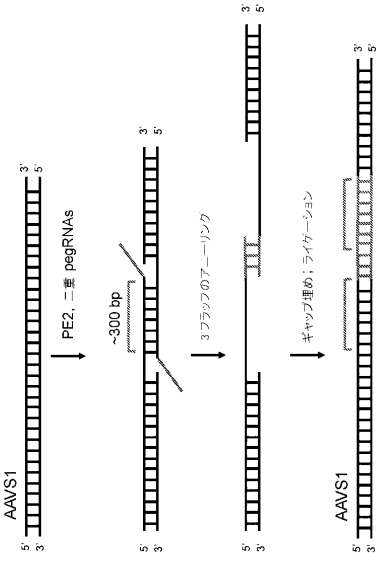


図 100A

【図１００Ｂ】

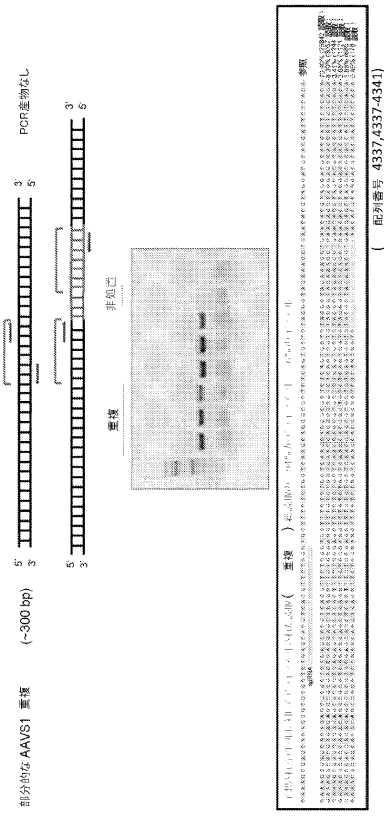


図 100B

【図１０１】

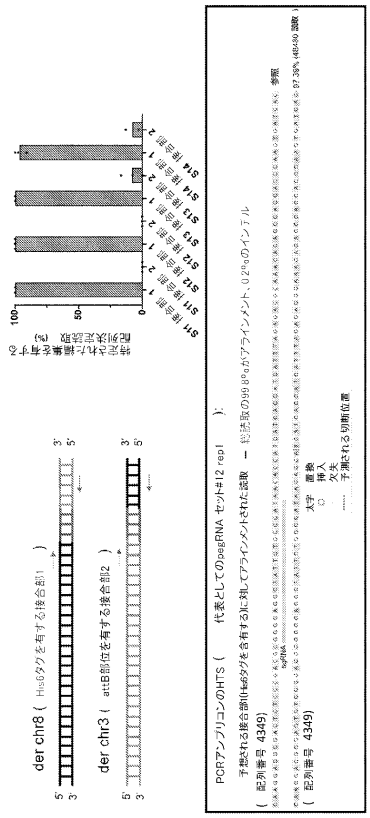


図 101

【図１０２Ａ】

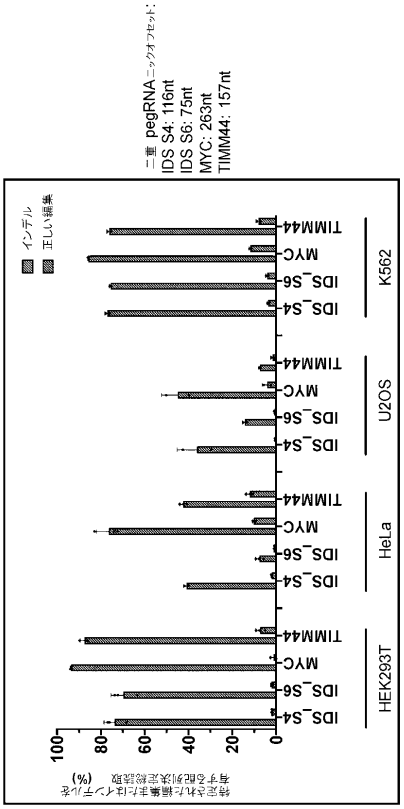


図 102A

【図１０２Ｂ】

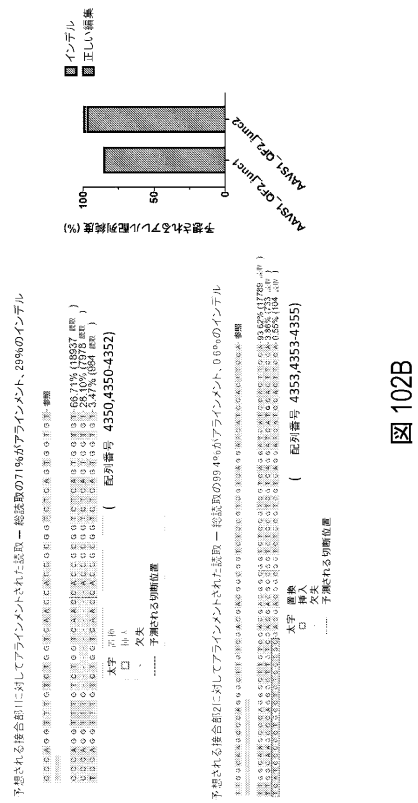


図 102B

【図１０３】

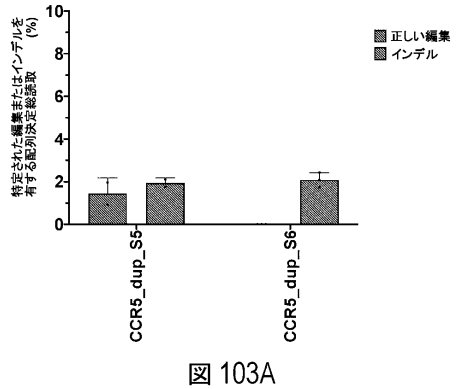


図 103A

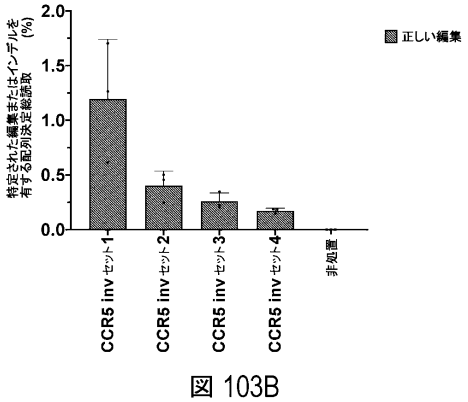


図 103B

【図１０４Ａ－Ｂ】

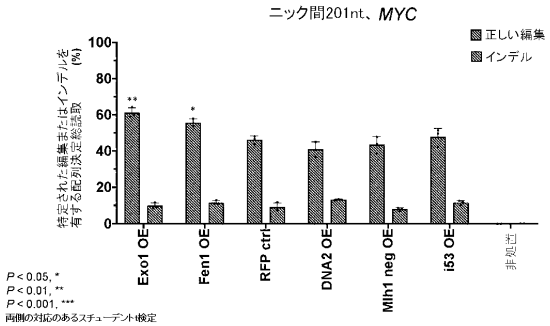


図 104A

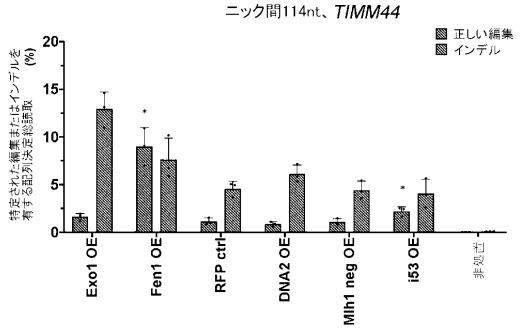


図 104B

【図１０４Ｃ－Ｄ】

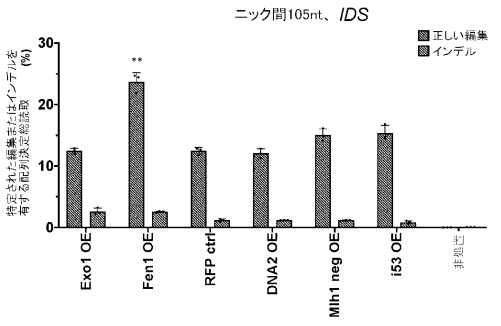


図 104C

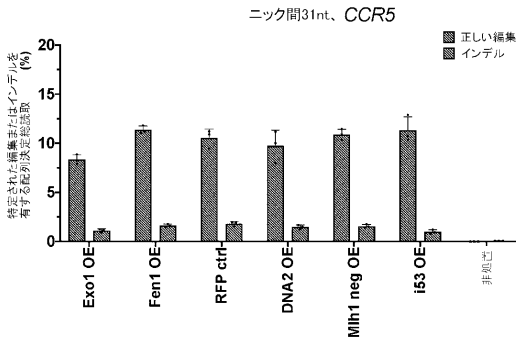


図 104D

【図１０４Ｅ】

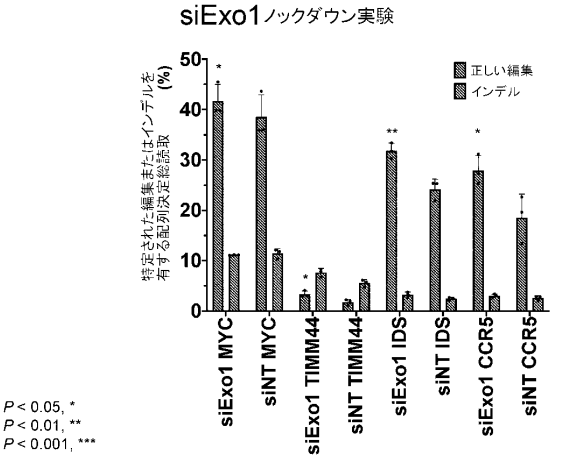


図 104E

【図１０５Ａ】

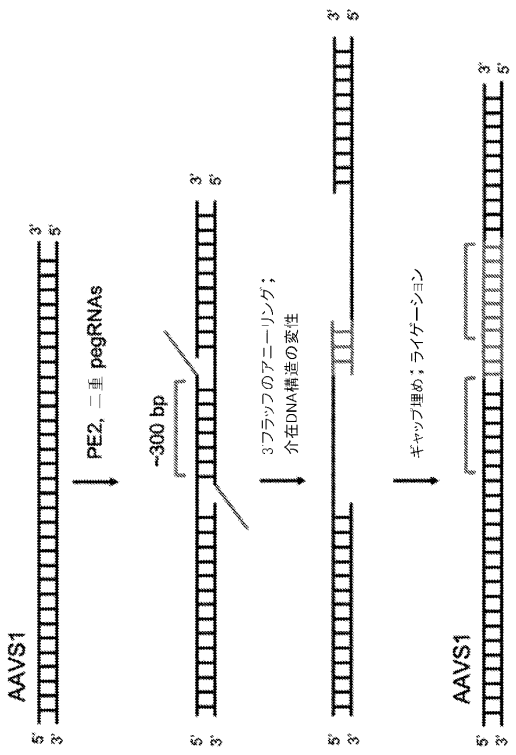


図 105A

【図１０５Ｂ】



図 105B

【図１０６】

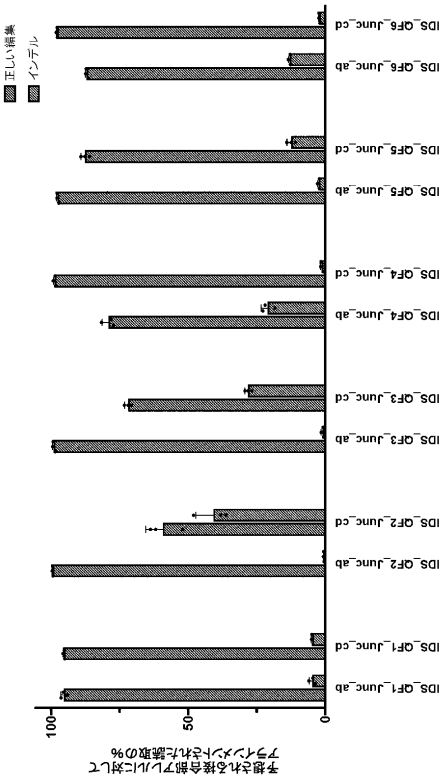


図 106

【図１０７】

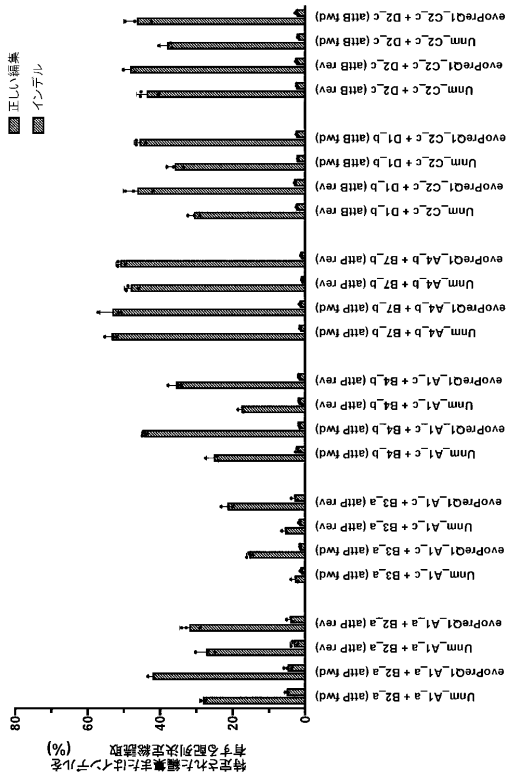


図 107

【図１０８Ａ】

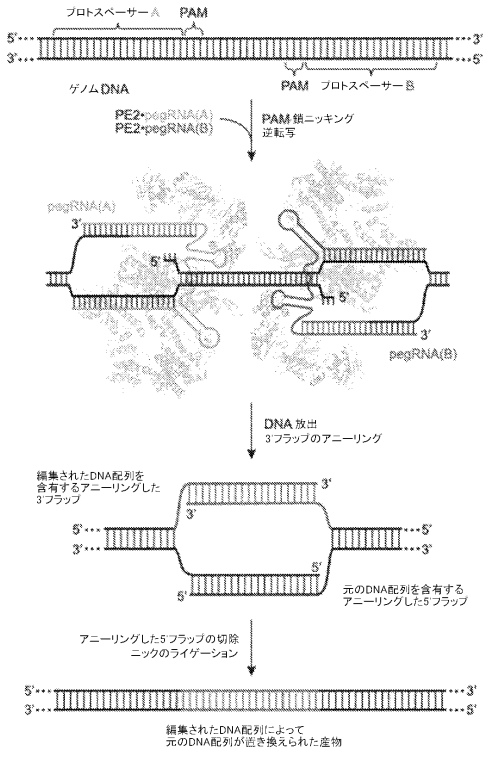


図 108A

【図１０８Ｂ－Ｃ】

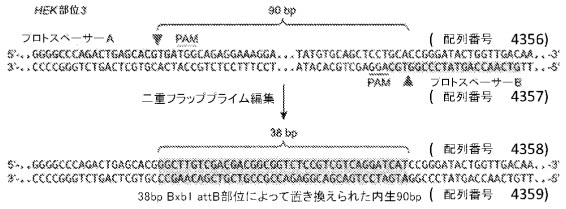


図 108B

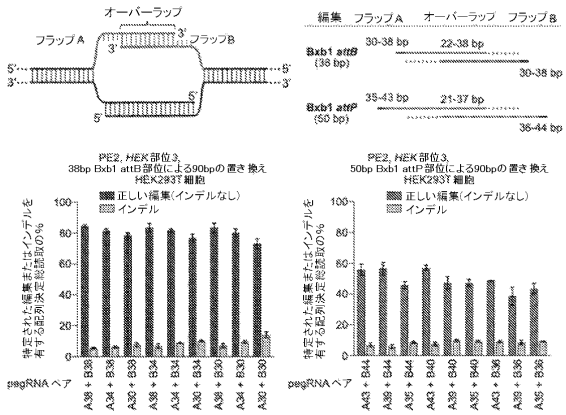


図 108C

【図１０９Ａ】

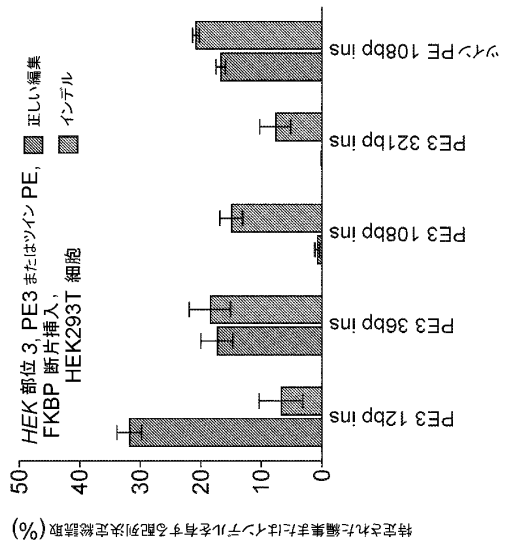


図 109A

【図１０９Ｂ】

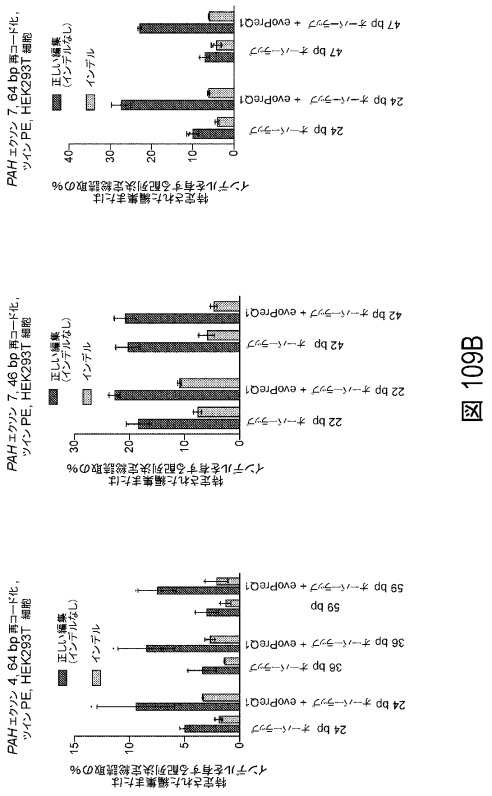


図 109B

【図１０９Ｃ－Ｄ】

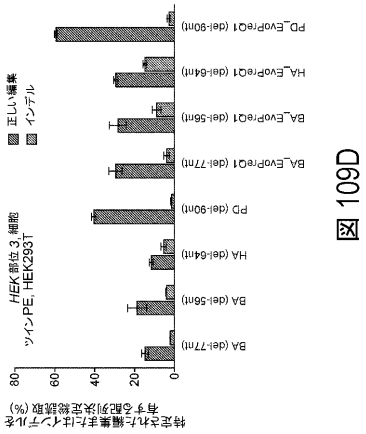


図 109D

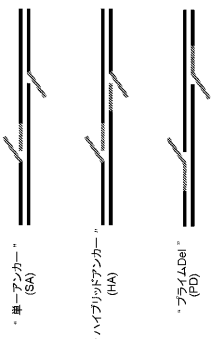


図 109C

【図１０９Ｅ】

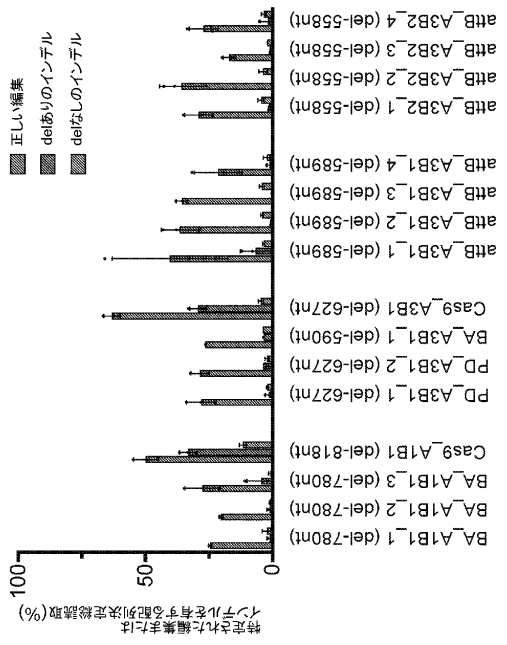


図 109E

【図１１０Ａ】

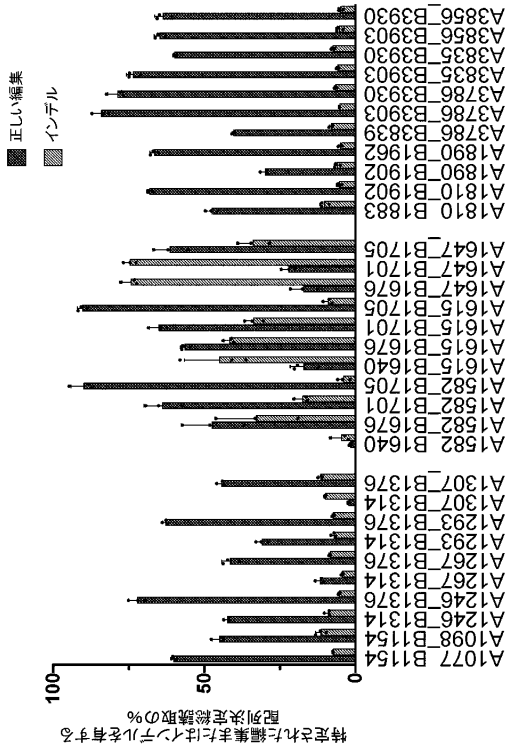


図 110A

【図１１０Ｂ－Ｃ】

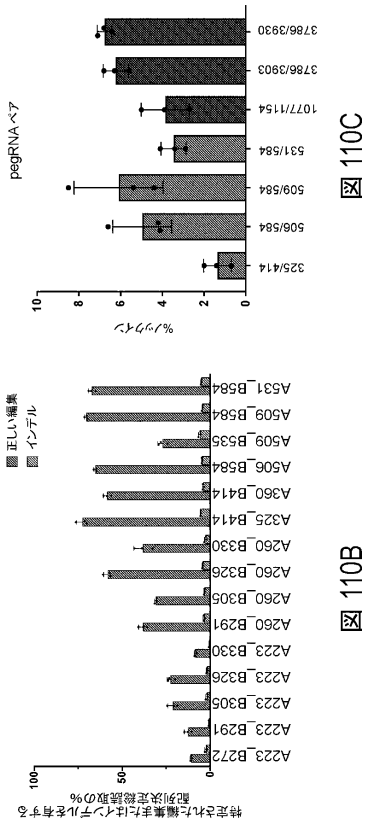


図 110B

図 110C

【図１１０Ｄ】

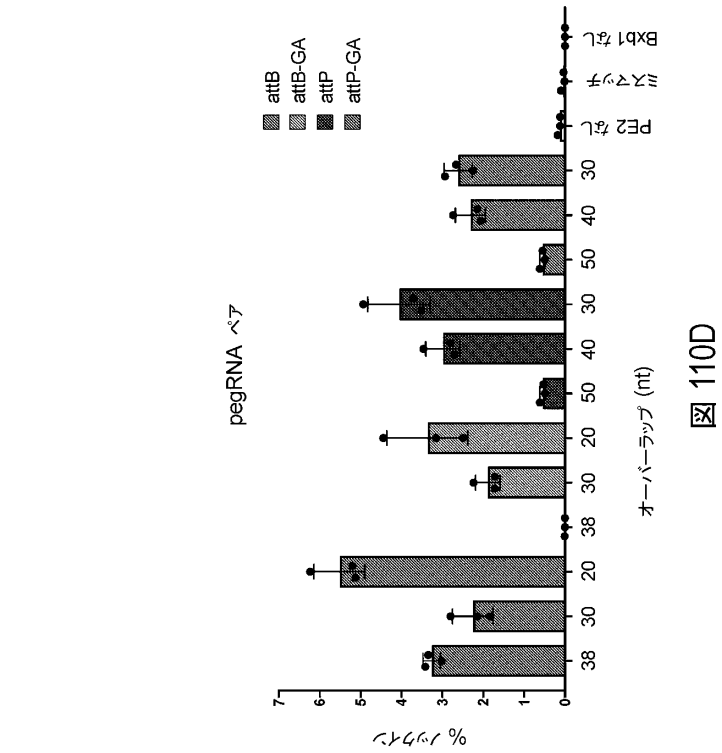


図 110D

【図１１０Ｅ－Ｆ】

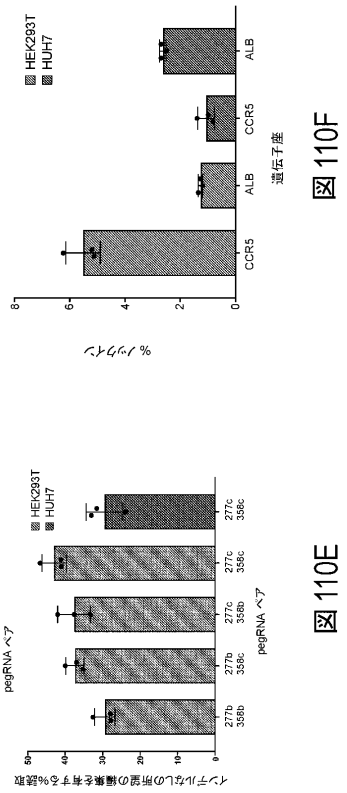


図 110E

図 110F

【図１１１Ａ】

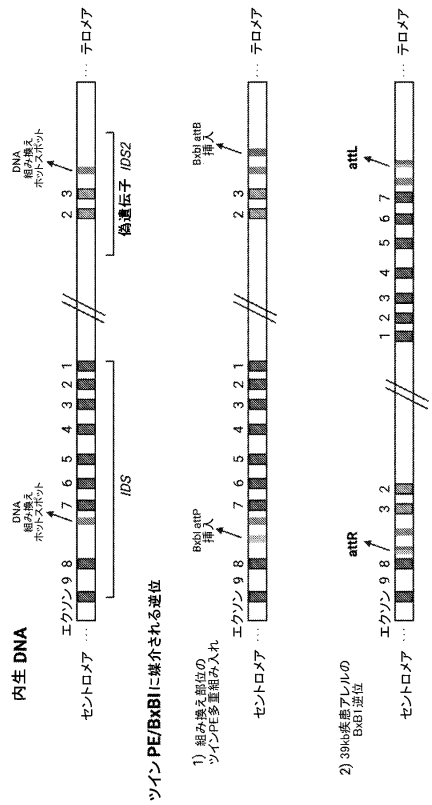


図 111A

【図１１１Ｂ】

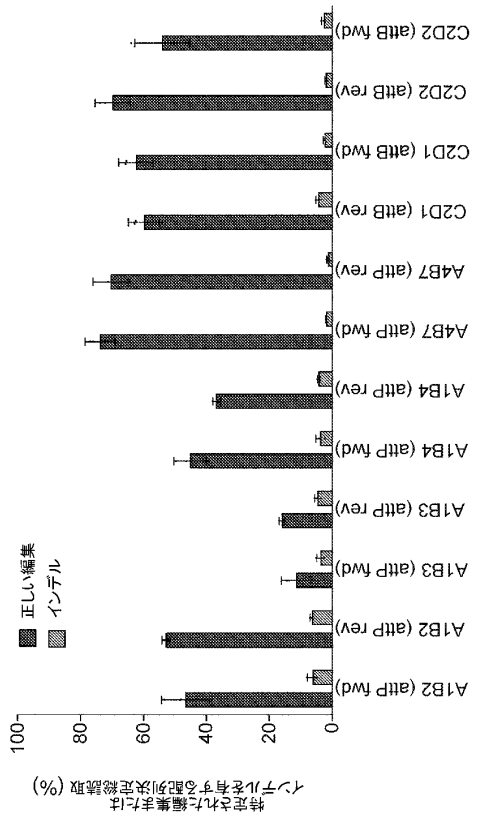


図 111B

【図１１１Ｃ－Ｄ】

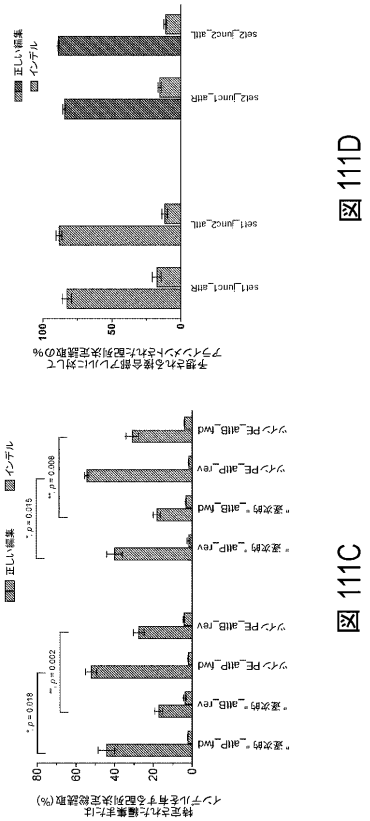


図 111D

図 111C

【図１１１Ｅ】

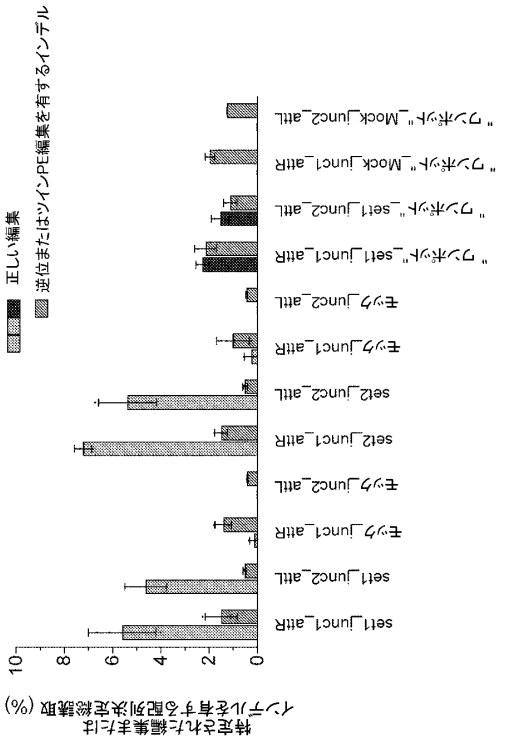


図 111E

【図１１２】

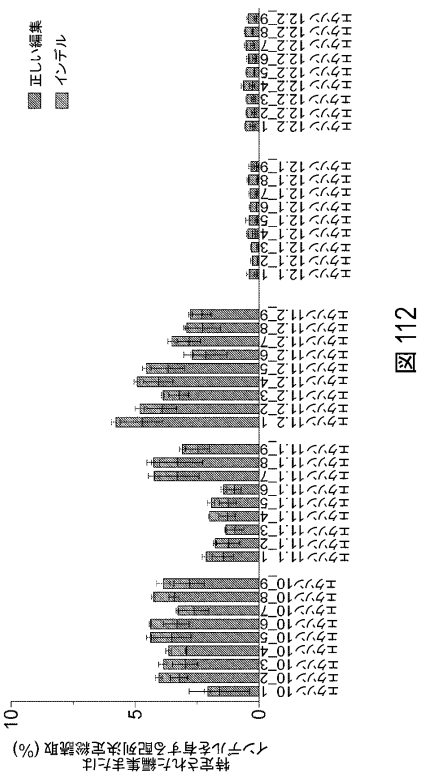


図 112

【図１１３】

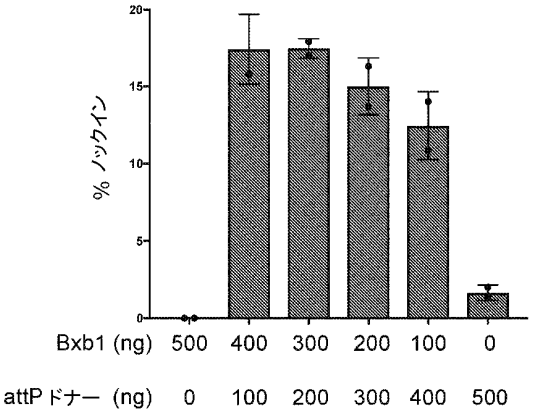


図 113

【図１１４】

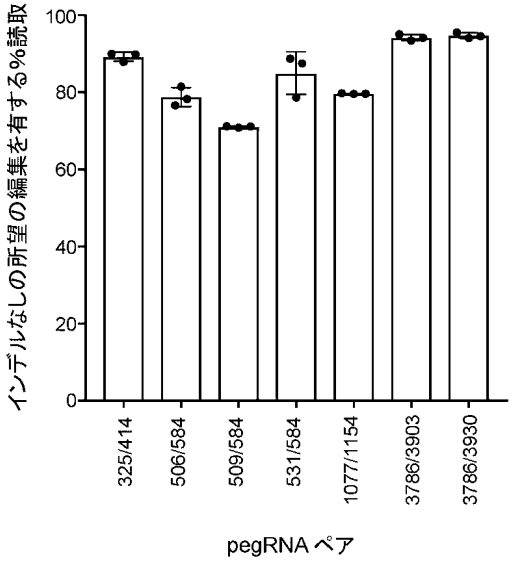


図 114

【図１１５】

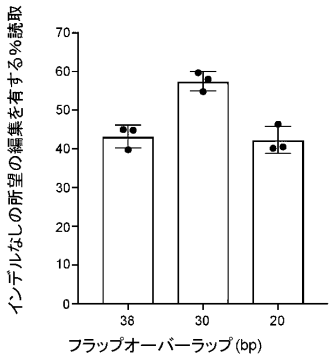


図 115A

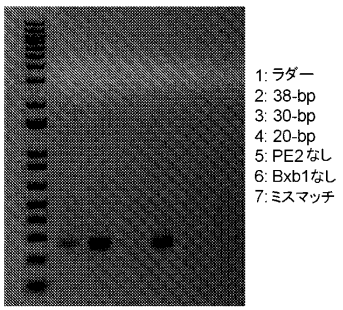


図 115B

【図１１６】

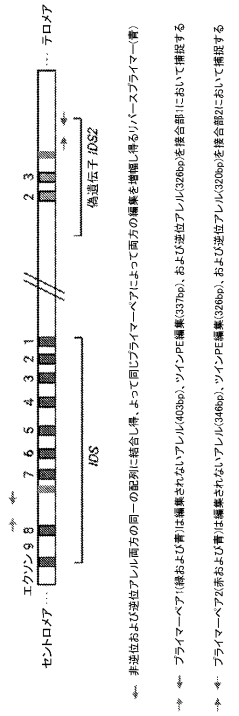


図 116

【配列表】

<u>202352530400000 1.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/031439

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. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/031439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 C12N9/12 C12N9/22 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, 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	ANZALONE ANDREW V ET AL: "Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA", NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD., ETC, LONDON, vol. 576, no. 7785, 21 October 2019 (2019-10-21), pages 149-157, XP036953141, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/S41586-019-1711-4 [retrieved on 2019-10-21] figure 1 ----- -/--	1-232

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

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 September 2021	22/09/2021

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/031439

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	XU WEN ET AL: "Multiplex nucleotide editing by high-fidelity Cas9 variants with improved efficiency in rice", BMC PLANT BIOLOGY, vol. 19, no. 1, 21 November 2019 (2019-11-21), XP55822087, DOI: 10.1186/s12870-019-2131-1 Retrieved from the Internet: URL:https://bmcplantbiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12870-019-2131-1.pdf> figure 2 -& Wen Xu ET AL: "Multiplex nucleotide editing by high-fidelity Cas9 variants with improved efficiency in rice Additional file 1", BMC Plant Biology, 21 November 2019 (2019-11-21), XP55829495, Retrieved from the Internet: URL:https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12870-019-2131-1/MediaObjects/12870_2019_2131_MOESM1_ESM.pptx [retrieved on 2021-08-02] figures S1, S2	1-232
Y	WO 2018/049168 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 15 March 2018 (2018-03-15) paragraph [0138] - paragraph [0143]; claims 1,22,35-60; figures 1,7	1-232
A	LEE HYE KYUNG ET AL: "Simultaneous targeting of linked loci in mouse embryos using base editing", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 9, no. 1, 7 February 2019 (2019-02-07), page 1662, XP55822053, DOI: 10.1038/s41598-018-33533-5 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41598-018-33533-5.pdf> figures 1,2	1-232
A	YANG LI ET AL: "One Prime for All Editing", CELL, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 179, no. 7, 12 December 2019 (2019-12-12), pages 1448-1450, XP085946337, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2019.11.030 [retrieved on 2019-12-12] figure 1	1-232

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/031439

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZUPENG WANG ET AL: "Optimized paired-sgRNA/Cas9 cloning and expression cassette triggers high-efficiency multiplex genome editing in kiwifruit", PLANT BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 16, no. 8, 13 January 2018 (2018-01-13), pages 1424-1433, XP055540759, GB ISSN: 1467-7644, DOI: 10.1111/pbi.12884 figures 1,2	1-232
A	MARZEC MAREK ET AL: "Prime Editing: A New Way for Genome Editing", TRENDS IN CELL BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE LTD, XX, vol. 30, no. 4, 27 January 2020 (2020-01-27), pages 257-259, XP086095541, ISSN: 0962-8924, DOI: 10.1016/J.TCB.2020.01.004 [retrieved on 2020-01-27] figure 1	1-232
X,P	LIN QIUPENG ET AL: "High-efficiency prime editing with optimized, paired pegRNAs in plants", NATURE BIOTECHNOLOGY, 25 March 2021 (2021-03-25), XP55822067, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/s41587-021-00868-w Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41587-021-00868-w.pdf> figure 1	1-232

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/031439

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018049168 A1	15-03-2018	EP 3510151 A1	17-07-2019
		US 2019330619 A1	31-10-2019
		WO 2018049168 A1	15-03-2018

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			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*25/00*	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P	*31/00*	*(2006.01)*	A61P	31/00		
A61P	*3/00*	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	１０５	
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*35/76*	*(2015.01)*	A61K	35/76		
A61K	*35/12*	*(2015.01)*	A61K	35/12		

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

ハーバード カレッジ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３８， ケンブリッジ， クインシー ストリート １７

(74)代理人 100102842
弁理士 葛和 清司

(72)発明者 リュウ，デイビッド，アール．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、ケア オブ ザ ブロード インスティテュート，インコーポレーテッド

(72)発明者 アンザロン，アンドリュー，ヴィト
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、ケア オブ ザ ブロード インスティテュート，インコーポレーテッド

(72)発明者 レビー，ジョナサン，マー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、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 ガオ，シン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、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 ポドラッキー，クリストファー，ジェイ．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１４２、ケンブリッジ、メイン ストリート ４１５、ケア オブ ザ ブロード インスティテュート，インコーポレーテッド

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA01 CA23 CA24 CA27 CA44
4C084 AA13 NA20 ZA011 ZA012 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262 ZB311 ZB312 ZC211 ZC212
4C087 AA01 BB65 BC83 ZA01 ZB21 ZB26 ZB31 ZC21

【要約の続き】
供される。