

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-526007

(P2023-526007A)

(43)公表日 令和5年6月20日(2023.6.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
	A 6 1 P 7/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全68頁)		

(21)出願番号	特願2022-568520(P2022-568520)	(71)出願人	591100596
(86)(22)出願日	令和3年5月12日(2021.5.12)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ
(85)翻訳文提出日	令和5年1月10日(2023.1.10)		ンテ エ ドゥ ラ ルシェ ルシュ メディカル
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/062633		フランス国、エフー 7 5 0 1 3 パリ、
(87)国際公開番号	WO2021/228944		リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1
(87)国際公開日	令和3年11月18日(2021.11.18)	(71)出願人	520053762
(31)優先権主張番号	20305488.7		ユニヴェルシテ・パリ・シテ
(32)優先日	令和2年5月13日(2020.5.13)		UNIVERSITE PARIS CI
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		TE
	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		フランス共和国、7 5 0 0 6 パリ、ブ
(81)指定国・地域	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(	(71)出願人	ールバール サン・ジェルマン 8 5
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		591140123
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		アシスタンス ビュブリクーオピトー ド
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,		ゥ パリ
	最終頁に続く		ASSISTANCE PUBLIQUE
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 β-ヘモグロビン異常症の処置のための塩基編集アプローチ

(57)【要約】

β-ヘモグロビン異常症の臨床歴は、遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（H P F H）の突然変異としても知られるH B Bクラスターの遺伝子変異に典型的には関連する成人期における胎児γ-グロビンの合成によって、重症度が緩和されることを示している。本発明者らは、γ-グロビンプロモーターにおける公知のH P F H突然変異の大半（C>T、G>A、T>C、又はA>G）が、C B E及びA B E媒介塩基編集アプローチを使用して再現することができることを同定した。特に、本発明者らは、C B E又はA B Eと組み合わせた場合に、H P F H突然変異を生じ、転写抑制因子の結合部位（-200及び-115の部位）を破壊するか、又は転写活性化因子によって認識されるde novo DNAモチーフ（例えば-198T>C、-175T>C、及び-113A>G）を生成するかのいずれかである、gRNAを設計した。-200及び-115領域に標的化するgRNAのサブセットが、同時にH P F H突然変異を生じ、また、L R F又はB C L 1 1 A結合部位内又はその周囲にH P F H突然変異以外の塩基の変化を作り、これはL R F及びB C L 1 1 Aの占有率を更に減少させ得るであろうと予測されることは特筆すべきである。したがって、本発明は、β-ヘモグロビン異常症の処置のための塩基編集アプローチに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞を、(a) 少なくとも 1 つの塩基編集酵素と (b) 該塩基編集酵素を、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内の少なくとも 1 つの標的配列に誘導するための少なくとも 1 つのガイド RNA 分子とからなる遺伝子編集プラットフォームに接触させ、これにより、該プロモーターを編集し、続いて、該真核細胞内のガンマグロビンの発現を増加させる工程を含む、真核細胞内の胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法。

【請求項 2】

前記遺伝子編集プラットフォームが、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内に -198 T>C 突然変異を導入し、これにより、KFL1 活性化因子はこれで該プロモーターに結合することができる、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記遺伝子編集プラットフォームが、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内に -175 T>C 突然変異を導入し、これにより、TAL1 活性化因子はこれで該プロモーターに結合することができる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子編集プラットフォームが、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内に -113 A>G 突然変異を導入し、これにより、GATA1 活性化因子はこれで該プロモーターに結合することができる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記遺伝子編集が、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内の -200 領域を編集するために使用され、これにより、LRF 抑制因子に対する結合部位が破壊される、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 6】

前記遺伝子編集プラットフォームが、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内に -201 C>T、-200 C>T、-197 C>T、-196 C>T、-195 C>T、及び -194 C>T からなる群より選択された少なくとも 1 つの突然変異を導入し、これにより、LRF 抑制因子に対する結合部位が破壊される、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記遺伝子編集が、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内の -115 領域を編集するために使用され、これにより、BCL11A 抑制因子に対する結合部位が破壊される、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 8】

前記遺伝子編集プラットフォームが、HBG 1 又は HBG 2 プロモーター内に -114 C>T、-113 C>T、-115 C>T、及び -116 C>T からなる群より選択された少なくとも 1 つの突然変異を導入し、これにより、BCL11A 抑制因子に対する結合部位が破壊される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

前記真核細胞が、造血前駆細胞、造血幹細胞 (HSC)、多能性細胞 (すなわち胚性幹細胞 (ES) 及び人工多能性幹細胞 (iPS)) からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

40

【請求項 10】

前記塩基編集酵素が、ニッカーゼ、より特定すると Cas9 ニッカーゼを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記ニッカーゼが、配列番号 3 又は配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記塩基編集酵素が、シチジンデアミナーゼ又はアデノシンデアミナーゼである、請求項 1 記載の方法。

50

【請求項 13】

前記デアミナーゼが、配列番号 4～14 に示されるアミノ酸配列の変異体からなる、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記塩基編集酵素が、ABEmax、AncBE4max、又はevoCDA1-BE4max-NGである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

前記塩基編集酵素及び対応するガイドRNA分子が、表 B に従って選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

複数のガイドRNA分子が、HBG1又はHBG2プロモーター内の複数の配列に標的化するように設計されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

複数のガイドRNA分子と共に、複数の塩基編集酵素が、HBG1又はHBG2プロモーター内の複数の配列に標的化するように設計されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】

それを必要とする被験者において胎児ヘモグロビンレベルを増大させるための方法であって、該方法は、上記の方法によって得られる真核細胞集団の治療有効量を移植することを含む、該方法。

【請求項 19】

前記被験者が、鎌状赤血球症又はβ-サラセミアなどのヘモグロビン異常症と診断されている、請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、医学、特に血液学の分野のものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

β-ヘモグロビン異常症（β-サラセミア及び鎌状赤血球症（SCD））は、成人のヘモグロビン（Hb）の合成又は構造に影響を及ぼす、β-グロビン遺伝子座内の突然変異によって引き起こされる単一遺伝子疾患である。β-サラセミアは、成人ヘモグロビン（HbA）四量体に含まれるβ-グロビン鎖の産生を減少（β⁺）又は消失（β⁰）させるβ-グロビン遺伝子（HBB）の遺伝子座の突然変異によって引き起こされ、これにより、結合していないα-グロビン鎖の沈降、赤血球系細胞の死滅、及び重度の貧血に至る（¹）。SCDでは、HBB遺伝子のA>T突然変異は、β-グロビン鎖の6位のグルタミン酸のバリンでの置換を引き起こし（β^S）、これは脱酸素により誘発される鎌状赤血球ヘモグロビン（HbS）の重合化の原因である。この初期事象は、赤血球（RBC）の鎌状化、溶血、血管閉塞性危機、多臓器障害を誘引し、しばしばひどく短くなった平均余命を伴う（²）。

【0003】

β-ヘモグロビン異常症の唯一の確実な治療法は、患者の30%未満に適用可能な選択肢である、HLA（ヒト白血球抗原）適合性ドナーに由来する同種造血幹細胞（HSC）の移植である（³）。自己の遺伝子改変されたHSCの移植に基づいた遺伝子療法アプローチは、適合性ドナーのない患者の処置選択肢として研究されている（⁴）。直接的な遺伝子の修正に基づいたゲノム編集技術が、β-ヘモグロビン異常症の治療アプローチを開発するために活用された。これらのアプローチは、特定のゲノム標的に対して相補的なシングルガイドRNA（gRNA）を介して、DNAの二本鎖切断（DSB）を誘導する、CRISPR/Cas9システムなどのデザイナーヌクレアーゼを使用する（⁴）。

10

20

30

40

50

【0004】

β-ヘモグロビン異常症の臨床歴は、β-サラセミア及びSCDのどちらの重症度も、遺伝性高胎児ヘモグロビン血症（HPFH）の突然変異としても知られるHBBクラスター内の遺伝子変異（欠失又は点突然変異）に典型的には関連する成人期における胎児γ-グロビンの合成によって緩和されることを示している⁽⁵⁾。胎児ヘモグロビン（HbF）は、β-サラセミアにおける成人ヘモグロビンの欠損を補い、γ-グロビンは、鎌状β鎖の突然変異体を置き換えることによって、SCDにおいて強力な抗鎌状化作用を発揮する⁽⁴⁾。特に、γ-グロビン遺伝子（HBG1及びHBG2）の2つの同一のプロモーターにおける突然変異は、転写活性化因子（TAL1、KLF1及びGATA1）によって認識されるde novo DNAモチーフを生成するか^(6、7、8)、又は、転写抑制因子（LRF及びBCL11A）の結合部位を破壊するかのいずれかである⁽⁹⁾。β-サラセミア及びSCDの両方の可能性ある治療法として、胎児γ-グロビンの発現を再活性化することを目標として、患者の造血幹／前駆細胞（HSPC）における遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異を模倣した、欠失又は挿入の発生を介するシス調節配列の破壊に基づき、その赤血球系前駆細胞における胎児ヘモグロビンの発現を再活性化する、いくつかのゲノム編集ストラテジーが開発された⁽¹⁰⁾。γ-グロビンプロモーター内のLRF及びBCL11Aの抑制因子の結合部位のCRISPR/Cas9による破壊は、胎児ヘモグロビンの発現を効率的に再活性化し、SCD RBCの表現型を寛解する⁽¹⁾。しかしながら、抑制因子結合部位を破壊する欠失の大部分は、マイクロホモロジー媒介末端結合（MMEJ）によって引き起こされ、これは、大半が分裂中の前駆細胞から構成される、HSPC集団の長期間かけて再増殖中の静止状態のHSCの画分においては効果的ではない場合がある^(11、12)。

10

20

【0005】

HSCは、特に複数のオンターゲット事象が存在する場合、又はオンターゲット事象とオフターゲット事象が同時に存在する場合、DNAのDSB⁽¹³⁾に対して非常に感度が高いことは特筆すべきである。高度に特異的なgRNAを使用する場合でさえ、Cas9/gRNAによるヒトHSPCの処置は、DNA傷害応答を誘導し、これによりアポトーシスに至り得る⁽¹⁴⁾。CRISPR/Cas9は、P53依存性の細胞毒性及び細胞周期停止を引き起こし得、その結果、機能的なP53経路を有する細胞の負の選択がなされる⁽¹⁵⁾。更に、いくつかのオンターゲットのDSB、オンターゲット及びオフターゲットの同時DSB、又は更には単一のオンターゲットのDSBの発生でさえ、欠失、逆位、及び転座のリスクを伴う⁽¹⁶⁾。したがって、DSBにより誘発されるDNA修復よりもむしろ、正確な塩基の編集に基づいたβ-ヘモグロビン異常症の新規で効果的で安全な治療ストラテジーの開発の方が優先される。

30

【0006】

近年、CRISPRシステムに基づいたシトシン塩基編集酵素及びアデニン塩基編集酵素（CBE及びABE）は、殆ど又は全くDSBを生じることなく、DNAのピンポイントな変化を起こすことができることが示された⁽¹⁷⁾。塩基編集酵素の基本成分は、触媒能のないCas9ヌクレアーゼ及びデアミナーゼであり；これらは最終的にC-GからT-Aへの、又はA-TからG-Cへの変換を生じる（それぞれCBE及びABEについて）⁽¹⁸⁾。塩基編集アプローチは、実質的にDSBを伴わない、正確なDNAの修復を可能とし、よってDSBにより誘発されるアポトーシス、転座、及びDNAの大部分の挿入又は欠失のリスクは排除される。更に、塩基編集は、Cas9ヌクレアーゼよりも低いレベルのオフターゲット活性を有する⁽¹⁷⁾。重要なことには、塩基編集は、静止状態の細胞で起こり、このことは、真正のHSCを、この新規技術を使用して遺伝子的に改変することができ⁽¹⁹⁾、これにより非相同末端結合（NHEJ）によって誘導される不均一かつ予測不可能な突然変異誘発と比較して、均一で予測可能な塩基変化が起こることを示唆する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0007】

発明の概要：

本発明は、特許請求の範囲によって定義される。特に、本発明は、 β -ヘモグロビン異常症の処置のための塩基編集アプローチに関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の詳細な説明：

本発明者らは、 γ -グロビンプロモーターにおける既知の遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異の大半 ($C > T$ 、 $G > A$ 、 $T > C$ 、又は $A > G$) は、 CBE 及び ABE により媒介される塩基編集アプローチを使用して再現することができることを同定した (図1)。 $CRISPR/Cas9$ ヌクレアーゼに基づいた戦略と比較して、塩基編集アプローチは、 γ -グロビンプロモーター内の複数の領域の同時標的化、例えば、 -200 及び -115 結合部位の両方を破壊する遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異の発生を可能とし得る。 γ -グロビン抑制における LRF 及び $BCL11A$ の独立した役割を考えると、これは、胎児ヘモグロビンの再活性化に対して相加作用を及ぼす可能性がある (20)。これに対し、 γ -グロビンプロモーターの2つの異なる領域 (例えば -200 及び -115) に標的化する $Cas9$ ヌクレアーゼに基づいた戦略はおそらく、介入配列の欠失をトリガーし、これはプロモーター活性にとって有害である可能性があるだろう (9)。更に、塩基編集は、転写活性化因子のための複数の新規結合部位が生じるように設計することができる (例えば $-198T > C$ 、 $-175T > C$ 、及び $-113A > G$) (21)。重要なことには、この配列は、 $HBG2$ 発現の欠失に至るであろう、2つの γ -グロビンプロモーターにおける同時切断から生じる、 $HBG1$ プロモーターと $HBG2$ プロモーターの間の領域の起こり得る $Cas9$ により媒介される欠失を回避するだろう (22)。本発明者らは以前に、この種類の欠失が、 $Cas9$ ヌクレアーゼにより編集される $HUDEP-2$ において $10 \sim 15\%$ の頻度で起こることを示した (11)。重要なことには、塩基編集アプローチは、マイクロホモロジー媒介末端結合経路に依拠せず、起こり得る DSB により誘発される毒性を回避するだろう。したがって、本発明者らは、 CBE 又は ABE と組み合わせた場合に、遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異を生じ、転写抑制因子の結合部位 (-200 及び -115 部位) を破壊するか、又は、転写活性化因子によって認識される *de novo* DNA モチーフ (例えば $-198T > C$ 、 $-175T > C$ 、及び $-113A > G$) を生成するかのいずれかである、 $gRNA$ を設計した (図1)。 -200 及び 115 領域に標的化する $gRNA$ のサブセットが、同時に遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異を生じ、また LRF 及び $BCL11A$ 結合部位内又はその周囲に遺伝性高胎児ヘモグロビン血症の突然変異以外の塩基変化を起こし、これにより更に LRF 及び $BCL11A$ の占有率が減少し得ることが予測されることは特筆すべきである (23)。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】 β -グロビン遺伝子座における、 $HBG1/2$ プロモーター内の $HPFH$ 突然変異。 $HBG2$ 及び $HBG1$ 遺伝子及びそれらのプロモーターを示した、第11番染色体上の β -グロビン遺伝子座の図解。 $HBG2$ 及び $HBG1$ の同一のプロモーターの配列 (HBG 転写開始点の上流にある -214 から -98 ヌクレオチド) が以下に示されている。黒色の矢印は、 $HBG1$ 及び/又は $HBG2$ プロモーターにおいて記載された $HPFH$ 突然変異を示す。転写活性化因子 ($TAL1$ 、 $KLF1$ 及び $GATA1$) 結合部位の新規作出をもたらす $HPFH$ 突然変異が、DNA 配列の上にある一方、転写抑制因子 (LRF 及び $BCL11A$) の破壊をもたらす $HPFH$ 突然変異は、DNA 配列の下にある。塩基編集によって生じ得る $HPFH$ 突然変異は、長方形で強調されている。楕円形は、転写活性化因子及び抑制因子を示す。塩基編集酵素と共に使用されるために設計された $gRNA$ の標的配列は、図の下の部分に報告され (黒い矢印で強調されている)、それらが結合する DNA 配列と共に整列している。標的塩基は、白色の太文字で強調され、残りのプロト

10

20

30

40

50

スパーサー配列は、灰色で強調されている。各 gRNA についての PAM（プロトスパーサー隣接モチーフ）は、矢印の最後に黒色で報告されている。

【図 2】K562 細胞内の HBG1 / 2 プロモーターの効率的な塩基編集。（A～M）サンガーシーケンスにかけられた試料中の、EditR ソフトウェアによって計算された、A-T から G-C（A-C、N）又は C-G から T-A（D-M）への塩基編集効率。塩基編集効率の比率は、バックグラウンドノイズと判断された対照における塩基変換率を差し引くことによって測定された。各グラフの上に、使用される標的及び酵素が示されている。データは、平均値 ± 標準偏差（n = 2～3 の生物学的に独立した実験）として表現される。（O）TIDE 分析によって測定された、挿入及び欠失（インデル）の頻度が、対照及び塩基編集試料について報告されている。（P）ドロップレットデジタル PCR によって測定される、4.9 kb の欠失の頻度が、対照及び塩基編集試料について、並びに陽性対照（基準の Cas9 ヌクレアーゼを用いて編集された K562 細胞から抽出された DNA）について報告されている。（Q）DiffLogo によって分析されるような塩基編集後の結合部位の変換⁽²⁶⁾。* 2 つの異なる gRNA（BCL11A__bs__1 及び BCL11A__bs__2）を、酵素 evocDA1-BE4max-NG 及び evofERNY-BE4max-NG と組み合わせて使用した（グラフ E 及び F）。同様に、2 つの異なる gRNA（LRF__bs__1 及び LRF__bs__2）を、CBE-SpRY 酵素と組み合わせて使用した（グラフ L 及び M）。

10

【図 3】HUDEP-2 細胞内の HBG1 / 2 プロモーターの効率的な塩基編集。サンガーシーケンスにかけられた試料中の、EditR ソフトウェアによって計算された、A-T から G-C（A-C）又は C-G から T-A（D-H）への塩基編集効率。塩基編集効率は、図 2 の説明文に記載のように計算された。各グラフの上に、使用される標的及び酵素が示されている。（I）TIDE 分析によって測定された、挿入及び欠失（インデル）の頻度が、対照及び塩基編集試料について報告されている。（J）DiffLogo によって分析されるような塩基編集後の結合部位の変換⁽²⁶⁾。* 2 つの異なる gRNA（BCL11A__bs__1 及び BCL11A__bs__2）を、酵素 evocDA1-BE4max-NG 及び evofERNY-BE4max-NG と組み合わせて使用した（グラフ E 及び F）。

20

【図 4】HUDEP-2 細胞における TAL1 及び KLF1 の結合部位の発生後の胎児ヘモグロビンの脱抑制。（A）赤芽球分化の 0 日目（D0）及び 9 日目（D9）におけるグリコホリン A（GPA）高い集団における胎児ヘモグロビン発現細胞の出現頻度（フローサイトメトリーによって決定されるような）。塩基編集効率は、各々の黒色の棒グラフの上に示されている（D0）。（B）赤芽球分化の 0 日目、6 日目及び 9 日目における β-及び γ-グロビン mRNA レベルの RT-qPCR 分析。β-及び γ-グロビン mRNA 発現は、α-グロビン mRNA に対して正規化され、全 β 様グロビンに対する比率として表現された。（C）逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）によって測定される γ-（^Gγ- + ^Aγ-）及び β-グロビン鎖の発現。β 様グロビン鎖の発現は、α-グロビンに対して正規化された。（D）陽イオン交換 HPLC による HbF 及び HbA の分析。本発明者らは、全体の Hb 四量体に対する、各 Hb 型の比率を計算した。（E～G）HUDEP-2 分化の 0 日目及び 9 日目における、後期赤血球系マーカー GYPA（E）及び初期赤血球系マーカー CD36（F）及び CD71（G）のフローサイトメトリー分析。

30

40

【図 5】HUDEP-2 細胞における BCL11A 結合部位の破壊時の HbF の再活性化。（A～C）HUDEP-2 の分化の 0 日目及び 9 日目における、後期赤血球系マーカー GYPA（A）並びに初期赤血球系マーカー CD36（B）及び CD71（C）のフローサイトメトリー分析。（D）赤芽球分化の 0 日目（D0）及び 9 日目（D9）における GPA 高い集団内の HbF 発現細胞の出現頻度（フローサイトメトリーによって決定されるような）。塩基編集効率が、各々の黒色の棒グラフの上に示されている（D0）。（E）赤芽球分化の 0 日目、6 日目及び 9 日目における、β-及び γ-グロビン mRNA レベルの RT-qPCR 分析。β-及び γ-グロビン mRNA の発現は、α-グロビン mRNA

50

に対して正規化され、全 β 様グロビンに対する比率として表現された。(F) RP-HPLCによって測定される γ -($^G\gamma$ -+ $^A\gamma$ -)及び β -グロビン鎖の発現。(G)陽イオン交換HPLCによるHbF及びHbAの分析。本発明者らは、全Hb四量体に対する、各Hb型の比率を計算した。

【図6】HUDEP-2細胞及びHSPCにおけるLRF結合部位の破壊時のHbFの増加。(A)未分化HUDEP-2細胞のGPA高い集団におけるHbF発現細胞の出現頻度(フローサイトメトリーによって決定されるような)。(B)LRF結合部位を編集するために、HSPCを、それぞれAncBE4max__NAA及びLRF__bs__1gRNAを発現している2つのプラスミドを用いてトランスフェクトした。サンガーシーケンスにかけられたHSPC試料における、EditRソフトウェアによって計算されるようなLRF結合部位における塩基編集効率。塩基編集効率の比率は、図2の説明文に記載のように計算された。TIDE分析によって測定される、挿入及び欠失(インデル)の頻度が、対照及び塩基編集試料について報告されている。(C)DiffLogoによって分析されるようなHSPC内の塩基編集後の結合部位の変換⁽²⁶⁾。(D)対照及びHBGの編集された赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)コロニーのバルク集団における、陽イオン交換HPLCによるHbF及びHbAの定量。本発明者らは、全Hb四量体に対する、各Hb型の比率をプロットした。対照細胞は、TE緩衝液を用いて、又はAncBE4max__NAAプラスミドのみを用いて、又はAncBE4max__NAAプラスミドと β -グロビン遺伝子座に関連していない部位に標的化しているgRNA試料を用いてのいずれかでトランスフェクトされた試料を含む。

【図7】K562細胞内の、HBG1/2プロモーター内の、低いRNAオフターゲット活性を有する酵素による塩基編集効率。サンガーシーケンスにかけられた試料における、EditRソフトウェアによって計算された、A-TからG-C(A-C)又はC-GからT-A(D)への塩基編集効率。塩基編集効率の比率は、図2の説明文に記載のように計算された。各グラフの上に、使用される標的及び酵素が示されている。各標的のために、本発明者らは、古典的な塩基編集酵素と、より低いRNAオフターゲット活性を有する塩基編集酵素を比較した。

【図8】SCDHSPCにおけるLRF結合部位を破壊するCBEの試験。サンガーシーケンスにかけられた試料における、EditRソフトウェアによって計算された、C-GからT-A(A及びB)への塩基編集効率。(C)TIDE分析によって測定された、挿入及び欠失(インデル)の頻度が、塩基編集試料について報告されている。(D)赤芽球分化の13日目における β^S -及び γ -グロビンmRNAレベルのRT-qPCR分析。 β^S -及び γ -グロビンmRNA発現は、 α -グロビンmRNAに対して正規化され、全 β 様グロビンに対する比率として表現された。(E)RP-HPLCによって測定された γ -($^G\gamma$ -+ $^A\gamma$ -)及び β^S -グロビン鎖の発現。 β 様グロビン鎖の発現は、 α -グロビンに対して正規化された。(F)陽イオン交換HPLCによるHbF及びHbSの分析。本発明者らは、全Hb四量体に対する各Hb型の比率を計算した。(G)赤芽球分化の19日目におけるグリコホリンA(GPA)高い集団における、HbF発現細胞の出現頻度(フローサイトメトリーによって決定されるような)。(H)偽トランスフェクトされた対照及び塩基編集試料における、酸素の除去時の非鎌状化細胞の出現頻度。(D-F及びH)各グラフの下に、塩基編集効率(BE%)、陽イオン交換HPLCによって測定されるような全Hb四量体に対するHbFの比率(HbF%)、及びフローサイトメトリーによって決定されるようなHbF発現細胞の出現頻度(F細胞%)が、各試料について示されている。ドナー数n=1。

【図9】SCDHSPCにおいて、LRF結合部位を破壊する又はKLF1結合部位を作出する、ABEの試験。サンガーシーケンスにかけられた試料における、EditRソフトウェアによって計算された、A-TからG-C(A及びD)への塩基編集効率。(E)TIDE分析によって測定された、挿入及び欠失(インデル)の出現頻度が、塩基の編集された試料について報告されている。(F)赤芽球分化の13日目における β^S -及び γ -グロビンmRNAレベルのRT-qPCR分析。 β^S -及び γ -グロビンmRNAの

発現が、 α -グロビンmRNAに対して正規化され、全 β 様グロビンに対する比率として表現された。(G)RP-HPLCによって測定される γ -($^G\gamma$ - + $^A\gamma$ -)及び β^S -グロビン鎖の発現。 β 様グロビン鎖の発現は、 α -グロビンに対して正規化された。(H)陽イオン交換HPLCによるHbF及びHbSの分析。本発明者らは、全Hb四量体に対する各Hb型の比率を計算した。(I)対照試料(偽トランスフェクトされ、関連性のないAAVS1遺伝子座において編集されている)及び塩基の編集された試料における、酸素除去時の、非鎌状化細胞の出現頻度。(J)赤芽球分化の19日目のグリコホリンA(GPA)高い集団における、HbF発現細胞の出現頻度(フローサイトメトリーによって決定されるような)。(F~I)各グラフの下に、塩基編集効率(BE%)、陽イオン交換HPLCによって測定されるような全Hb四量体に対するHbFの比率(HbF%)、及びフローサイトメトリーによって決定されるようなHbF発現細胞の出現頻度(F細胞%)が、各試料について示されている。ドナー数n=1。

【図10】K562細胞及びSCD HSPCにおける、HBG1/2プロモーターでのRNAにより媒介される塩基編集。(A~H)K562及びHSPCにおける、A-TからG-C又はC-GからT-Aへの塩基編集効率。サンガーシーケンスにかけられたK562細胞(A~E)及びSCD HSPC(F~H)試料における塩基編集効率が、EditRソフトウェアによって計算された。各グラフの上に、使用された酵素及びgRNAが示されている。

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義：

本明細書において使用する「 β -ヘモグロビン異常症」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、個体の任意のヘモグロビンの構造又は機能の任意の異常を指し、そして、 β -グロビン遺伝子のコード領域の欠失突然変異若しくは置換突然変異などの任意の突然変異、又は、正常な容態若しくは標準的な容態と比較して、ヘモグロビン産生量の減少を引き起こす、このような遺伝子のプロモーター若しくはエンハンサー内の突然変異若しくはその欠失によって引き起こされる、ヘモグロビンの一次、二次、三次、若しくは四次構造の異常を含む。

【0011】

本明細書において使用する「鎌状赤血球症」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、グロビン遺伝子の突然変異から生じ、異常で硬く鎌状形を呈する赤血球によって特徴付けられる、常染色体劣性遺伝性血液疾患の一群を指す。それらは、ペプチドの6位のアミノ酸のグルタミン酸がバリンによって置換されている、 β -グロビン鎖変異体をコードしている β^S -グロビン遺伝子の存在によって定義される：ヘモグロビン四量体における β^S -グロビン(HbS、鎌状ヘモグロビン)の取り込みは、ヘモグロビンの重合及び臨床表現型をもたらす。該用語は、鎌状細胞貧血(HbSS)、鎌状ヘモグロビンC疾患(HbSC)、鎌状 β プラスサラセミア(HbS/ β^+)、又は鎌状 β -ゼロサラセミア(HbS/ β^0)を含む。

【0012】

本明細書において使用する「 β -サラセミア」という用語は、正常なヘモグロビン四量体タンパク質の産生低下、及び対を形成していない遊離 α -グロビン鎖の沈降をもたらす、 α -グロビンポリペプチド鎖と β 様グロビンポリペプチド鎖の変化した比から生じる、ヘモグロビン異常症を指す。

【0013】

本明細書において使用する「造血幹細胞」又は「HSC」という用語は、自己再生し、血液細胞の前駆体へと分化する能力を有する、血液細胞を指す。これらの前駆細胞は、自己再生できず、かつ成熟した血液細胞へと分化しなければならない未熟血液細胞である。造血幹前駆細胞は、多くの表現型、例えばLin-CD34+CD38-CD90+CD45RA-、Lin-CD34+CD38-CD90-CD45RA-、Lin-CD34+CD38+IL-3alloCD45RA-、及びLin-CD34+CD38+CD

10+を示す (Daley et al., Focus 18:62-67, 1996; Pimentel, E., Ed., Handbook of Growth Factors Vol. III: Hematopoietic Growth Factors and Cytokines, pp. 1-2, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1994)。骨髓微小環境内では、幹細胞は自己再生し、一生を通じて全ての成熟血液細胞を生じる、造血幹細胞の持続的な産生を維持する。いくつかの実施態様では、造血前駆細胞又は造血幹細胞は、末梢血液細胞から単離される。

【0014】

本明細書において使用する「末梢血液細胞」という用語は、循環中の血液プール内に見られる、赤血球、白血球、及び血小板を含んでいる、血液の細胞性成分を指す。いくつかの実施態様では、真核細胞は骨髓由来幹細胞である。

【0015】

本明細書において使用する「骨髓由来幹細胞」という用語は、骨髓に見られる幹細胞を指す。幹細胞は、多能性を有する接着性間質細胞型として、又は、血液細胞へと分化することのできる造血幹細胞を識別するCD34若しくはCD45細胞表面タンパク質を発現する細胞としてのいずれかで、骨髓内に存し得る。

【0016】

本明細書において使用する「動員」又は「幹細胞の動員」という用語は、動員剤を用いての処置後に、幹細胞の滞留している組織又は臓器から末梢血への補充に関与するプロセスを指す。このプロセスは、損傷及び炎症中のストレスシグナルに応答した、組織又は臓器からの幹細胞の生理学的放出の増強を模倣する。動員プロセスの機序は、投与される動員剤の種類に依存する。いくつかの動員剤は、幹細胞がそれらの微小環境の細胞又は組織に付着するのを妨げる、アゴニスト又はアンタゴニストとして作用する。他の動員剤は、幹細胞とその付着部位との間の接着分子又は支持構造を切断するプロテアーゼの放出を誘導する。

【0017】

本明細書において使用する「動員剤」という用語は、幹細胞の滞留している組織又は臓器から、例えば骨髓（例えばCD34⁺幹細胞）及び脾臓（例えばHox11陽性幹細胞）から末梢血への動員を増強するように作用する、多種多様な分子を指す。動員剤としては、化学療法薬、例えばシクロホスファミド及びシスプラチン；サイトカイン及びケモカイン、例えば顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、幹細胞因子（SCF）、Fms関連チロシンキナーゼ3（flt-3）リガンド、間質細胞由来因子1（SDF-1）；ケモカイン（C-Cモチーフ）受容体1（CCR1）のアゴニスト、例えばケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド3（CCL3、マクロファージ炎症タンパク質-1 α （Mip-1 α ）としても知られる）；ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体1（CXCR1）及び2（CXCR2）のアゴニスト、例えばケモカイン（C-X-Cモチーフ）リガンド2（CXCL2）（増殖関連発癌遺伝子タンパク質- β （Gro- β ）としても知られる）、及びCXCL8（インターロイキン-8（IL-8）としても知られる）；CXCR4のアゴニスト、例えばCTCE-02142、及びMet-SDF-1；最晩期抗原（VLA）-4阻害剤；CXCR4のアンタゴニスト、例えばTG-0054、プレリキサフォル（AMD3100としても知られる）、及びAMD3465、又は前記の薬剤の任意の組合せが挙げられる。動員剤は、末梢血中の幹細胞の数を増加させ、よって、移植、臓器の修復若しくは再生、又は疾患の処置に使用するための幹細胞のより入手しやすい入手源が可能となる。

【0018】

本明細書において使用する「単離された細胞」という用語は、それが元来見られていた生物から取り出されたか、又はこのような細胞の子孫である細胞を指す。場合により、真核細胞は、インビトロで、例えば他の細胞の存在下で培養される。場合により、真核細胞は、第二の生物に後で導入されるか、又はそれ（又は子孫である細胞）が単離された生物に再導入される。本明細書において使用するような、本明細書において使用する単離された細胞集団に関する「単離された集団」という用語は、混合された又は不均一な細胞集団

10

20

30

40

50

から取り出されたか又は分離された、細胞集団を指す。いくつかの実施態様では、単離された集団は、不均一な集団（これから細胞が単離又は濃縮された）と比較して、実質的に純粋な細胞集団である。

【0019】

本明細書において使用する「ガンマグロビン」又は「 γ -グロビン」という用語は、当技術分野にけるその一般的な意味を有し、HBG1遺伝子及びHBG2遺伝子によってヒトにおいてコードされているタンパク質を指す。HBG1遺伝子及びHBG2遺伝子は通常、胎児の肝臓、脾臓、及び骨髄に発現されている。2本の γ -グロビン鎖は、2本の α -グロビン鎖と一緒に、胎児ヘモグロビン（HbF）を構成し、これは通常、生誕翌年に成人ヘモグロビン（HbA）によって置換される（Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ (May 1989). "A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster". Blood. 73 (5): 1081-104.）。HBG1及びHBG2のENSEMBL ID（すなわちEnsembleゲノムブラウザーデータベースの遺伝子識別番号）は、それぞれENSG00000213934及びENSG00000196565である。

10

【0020】

本明細書において使用する「胎児ヘモグロビン含量を増加させる」という表現は、胎児ヘモグロビンが、関連性のない遺伝子座に標的化するエンドヌクレアーゼが存在するか又はエンドヌクレアーゼが全く存在しない、同等な真核細胞よりも、DNA標的化エンドヌクレアーゼで処置された真核細胞の方が、少なくとも5%高いことを示す。いくつかの実施態様では、該真核細胞における胎児ヘモグロビンの発現の比率は、真核細胞よりも少なくとも10%高い、少なくとも20%高い、少なくとも30%高い、少なくとも40%高い、少なくとも50%高い、少なくとも60%高い、少なくとも70%高い、少なくとも80%高い、少なくとも90%高い、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、又はそれ以上である。いくつかの実施態様では、当技術分野において公知である任意の方法、例えば、胎児 γ -グロビタンパク質の高速液体クロマトグラフィー分析、及び胎児 γ -グロビンmRNAのRT-qPCR分析を使用して、胎児ヘモグロビンの発現増加を測定することができる。典型的には、該方法は、実施例に記載されている。

20

【0021】

本明細書において使用する「発現」という用語は、ポリヌクレオチドが、DNA鋳型から（例えばmRNA又は他のRNA転写物へと）転写されるプロセス、及び／又は、転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質へと翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされるポリペプチドはまとめて、「遺伝子産物」と称されてもよい。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞内のmRNAをスプライシングする工程を含み得る。

30

【0022】

本明細書において使用する「プロモーター」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、プロモーター配列に作動可能に連結された遺伝子の発現に必要とされる、核酸配列を指す。HBG1及びHBG2プロモーターは、-221bpまで同一であり、配列番号1に示され図1に示されるような核酸配列を含む。本発明によると、配列番号1内の第一ヌクレオチドは、HBG転写開始部位の上流の-210位に位置するヌクレオチドを示し、配列番号1内の最後のヌクレオチドは、HBG転写開始部位の上流の-100位に位置するヌクレオチドを示す。例えば、
- HBG1又はHBG2プロモーター内の-201位のヌクレオチドは、配列番号1の10位のヌクレオチドを示す、
- HBG1又はHBG2プロモーター内の-200位のヌクレオチドは、配列番号1の11位のヌクレオチドを示す、
- HBG1又はHBG2プロモーター内の-198位のヌクレオチドは、配列番号1の13位のヌクレオチドを示す、

40

50

- H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 9 7 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 1
 4 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 9 6 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 1
 5 位のヌクレオチドを示す、及び
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 9 5 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 1
 6 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 9 4 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 1
 7 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 7 5 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 3
 6 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 1 7 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 9
 4 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 1 6 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 9
 5 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 1 5 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 9
 6 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 1 4 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 9
 7 位のヌクレオチドを示す、
 - H B G 1 又は H B G 2 プロモーター内の - 1 1 3 位のヌクレオチドは、配列番号 1 の 9
 8 位のヌクレオチドを示す。

10

20

【 0 0 2 3 】

配列番号 1 : > H B G 1 又は H B G 2 のプロモーターの配列

【 化 1 】

```

TTGGGGGGCCCTTCCCCACACTATCTCAATGCAAATATCTGTCTGAAACGGTCCCTGGCTAAACTCCAC
CCATGGGTTGGCCAGCCTTGCCTTGACCAATAGCCTTGACAA

```

【 0 0 2 4 】

本明細書において使用する H B G 1 又は H B G 2 のプロモーター内の「- 2 0 0 領域」
 は、- 1 9 7 位；- 1 9 6 位及び - 1 9 5 位のヌクレオチドを包含する領域を指し、よっ
 て、配列番号 1 における 1 1 位のヌクレオチド（すなわち - 2 0 0）から始まり 2 1 位の
 ヌクレオチド（すなわち - 1 9 0）までの領域、より好ましくは配列番号 1 における 1 4
 位のヌクレオチドから始まり 1 6 位のヌクレオチドまでの領域に関する。

30

【 0 0 2 5 】

本明細書において使用する H B G 1 又は H B G 2 のプロモーター内の「- 1 1 5 領域」
 は、- 1 1 6 位；- 1 1 5 位；- 1 1 4 位；及び - 1 1 3 位のヌクレオチドを包含する領
 域を指し、したがって、配列番号 1 における 9 5 位のヌクレオチド（すなわち - 1 1 5）
 から始まり 9 8 位のヌクレオチド（すなわち - 1 1 3）までの領域に関する。

【 0 0 2 6 】

本明細書において使用する「活性化因子」という用語は、1 つの遺伝子又は遺伝子のセ
 ットの遺伝子転写を増加させるタンパク質（転写因子）である、転写活性化因子を指す。
 大半の活性化因子は、エンハンサー又はプロモーター近位配列に結合する D N A 結合性タ
 ンパク質である。本開示によると、活性化因子は、K L 1、T A L 1 及び G A T A 1 から
 なる群より選択される。

40

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用する「転写活性化因子結合部位」という用語は、本開示に記載の
 転写活性化因子が結合する、D N A 上に存在する部位を指す。本発明によると、本発明の
 塩基編集酵素は、真核細胞のゲノム配列を編集し、これにより、活性化因子は、その転写
 活性化因子結合部位に結合することができる。

【 0 0 2 8 】

50

本明細書において使用する「K L F 1」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、クルッペル様因子1タンパク質を指す。該用語は、E K L F ; E K L F / K L F 1としても知られる。K L F 1は、成人β-グロビン及び他の赤血球系遺伝子の高レベルの発現を誘導する造血特異的転写因子である。ジンクフィンガータンパク質は、βヘモグロビンプロモーターに見られるDNA配列に結合する。

【0029】

本明細書において使用する「T A L 1」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、赤芽球分化誘導因子であるT A L b H L H転写因子1を指す。該用語は、S C L ; T C L 5 ; t a l - 1 ; 及びb H L H a 1 7としても知られる。

【0030】

本明細書において使用する「G A T A 1」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、G A T A結合性タンパク質1を指す。該用語は、G F 1 ; G F - 1 ; N F E 1 ; X L T T ; E R Y F 1 ; N F - E 1 ; X L A N P ; X L T D A ; 及びG A T A - 1としても知られる。G A T A 1は、G A T A転写因子ファミリーに属するタンパク質である。該タンパク質は、胎児ヘモグロビンから成人ヘモグロビンへの切り替えを調節することによって、赤血球系発達において重要な役割を果たす。

【0031】

本明細書において使用する「抑制因子」という用語は、1つの遺伝子又は遺伝子のセットの遺伝子転写を減少させるタンパク質（転写因子）である、転写抑制因子を指す。大半の抑制因子は、エンハンサー又はプロモーター近位配列に結合するDNA結合性タンパク質である。本開示によると、抑制因子は、B C L 1 1 A及びL R Fからなる群より選択される。

【0032】

したがって、「転写抑制因子結合部位」という用語は、転写抑制因子が結合する、DNA上に存在する部位を指す。いくつかの実施態様では、本発明の塩基編集酵素は、真核細胞のゲノム配列を編集するので、転写抑制因子は、その転写抑制因子の結合部位に結合することができない。いくつかの実施態様では、本発明のDNA標的化エンドヌクレアーゼは、L R F又はB C L 1 1 Aのその結合部位への結合を阻害するだろう。

【0033】

本明細書において使用する「B C L 1 1 A」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、B A Fクロマチンリモデリング複合体サブユニットB C L 1 1 Aをコードしている遺伝子（遺伝子識別番号：53335）を指す。該用語は、E V I 9 ; C T I P 1 ; D I L O S ; Z N F 8 5 6 ; H B F Q T L 5 ; B C L 1 1 A - L ; B C L 1 1 A - S ; B C L 1 1 a - M ; 又はB C L 1 1 A - X Lとしても知られる。別個のアイソフォームをコードしている、5つの選択的にスプライシングされたこの遺伝子の転写変異体が報告されている。該タンパク質は、クロマチンのリモデリングを介して、遺伝子の発現を調節する、S W I / S N F複合体と会合する。B C L 1 1 Aは、いくつかの造血系統において高度に発現され、胎児から成人に移行する間に、γ-グロビンからβ-グロビンへの切り替えにおいて役割を果たす（Sankaran VJ et al. "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor B C L 1 1 A", Science Science. 2008 Dec 19;322(5909):1839-42）。

【0034】

本明細書において使用する「L R F」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、Z B T B 7 A遺伝子によってコードされる、白血病／リンパ腫関連因子（L R F）である、転写抑制因子を指す。L R Fは、C末端C 2 H 2型ジンクフィンガーを通してDNAに結合し、そしておそらくそのN末端B T Bドメインを通して転写抑制因子複合体をリクルートする、Z B T B転写因子である（Lee SU, Maeda T. Immunol. Re v. 2012;247:107-119）。

【0035】

本明細書において使用する「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という

10

20

30

40

50

用語は、本明細書において同義語として使用され、任意の長さのアミノ酸ポリマーを指す。該ポリマーは、鎖状であっても分枝状であってもよく、それは修飾されたアミノ酸を含んでいてもよく、それは非アミノ酸が介在していてもよい。該用語はまた、修飾されている；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、PEG化、又は任意の他の操作、例えば標識化成分とのコンジュゲーションなどを受けたアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書において使用する「アミノ酸」という用語は、天然及び／又は非天然又は合成のアミノ酸、例えばグリシン及びD体若しくはL体の両方の光学異性体、並びにアミノ酸類似体、及びペプチド模倣体を含む。

【0036】

本明細書において使用する「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、DNA分子（例えばであって以下に限定されないが、cDNA又はゲノムDNA）を指す。核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

【0037】

本明細書において使用する「単離された」という用語は、核酸分子又はポリペプチドに言及する場合、核酸分子又はポリペプチドが、それが天然の状態では会合しているか又は一緒に見られる、少なくとも1つの他の成分を実質的に含有していないことを意味する。

【0038】

本明細書において使用する「相補性」という用語は、核酸が、伝統的なワトソンクリック塩基対形成又は他の非伝統的なタイプのいずれかによって、別の核酸配列と水素結合（群）を形成できることを指す。相補率は、第二の核酸配列と水素結合（例えばワトソンクリック塩基対形成）を形成することができる、核酸分子内の残基の比率（例えば、10個中5個、6個、7個、8個、9個、10個は、50%、60%、70%、80%、90%及び100%相補性である）を示す。「完全に相補的」とは、核酸配列の全ての連続した残基が、第二の核酸配列内の同じ数の連続残基と水素結合を形成するであろうことを意味する。本明細書において使用する「実質的に相補的」とは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、又はそれ以上のヌクレオチドの領域にわたり、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%である相補度を指すか、あるいは、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2本の核酸を指す。

【0039】

本明細書において使用するハイブリダイゼーションのための「ストリンジェントな条件」という用語は、標的配列に対して相補性を有する核酸が、主に標的配列にハイブリダイズし、実質的に非標的配列にはハイブリダイズしない、条件を指す。ストリンジェントな条件は一般的に配列依存性であり、多くの因子に応じて変化する。一般的には、配列が長ければ長いほど、配列がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度はより高くなる。ストリンジェントな条件の非制限的な例は、Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.に詳述されている。

【0040】

本明細書において使用する「ハイブリダイゼーション」又は「ハイブリダイズしている」という用語は、完全に又は部分的に相補的な核酸鎖が、特定のハイブリダイゼーション条件下で集合し、2本の構成鎖が水素結合によって接続されている、二本鎖構造又は領域を形成する、プロセスを指す。水素結合は典型的には、アデニンとチミン又はウラシル（AとT又はU）、又はシトシンとグアニン（CとG）の間で形成されるが、他の塩基対も形成され得る（例えば、Adams et al., *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11th ed., 1992）。

【0041】

本明細書において使用する「塩基編集酵素」という用語は、デアミナーゼポリペプチドに連結された不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼを含んでいる、融合タンパク質を指す。該用語は、「塩基エディター」としても知られる。2つのクラスの塩基編集酵素、すなわちシトシン塩基編集酵素（CBE）及びアデニン塩基編集酵素（ABE）を使用して、二本鎖の切断を伴うことなく、1塩基対の編集を行うことができる。典型的には、シトシン塩基編集酵素は、不完全なCRISPR/CasヌクレアーゼをAPOBECのようなシチジンデアミナーゼに融合することによって作出される。該塩基編集酵素は、gRNAによって特定の遺伝子座に標的化され、それらは、PAM部位の近くの小さな編集窓内でシチジンをウリジンへと変換することができる。ウリジンは、続いて、塩基切断修復を通してチミジンへと変換され、CからTへの変化（又は反対鎖上ではGからAへ）が作出される。同様に、アデノシン塩基編集酵素は、不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼを、アデノシンデアミナーゼに縮合することによって作出される。該塩基編集酵素は、アデノシンをイノシンへと変換するように工学操作されており、このイノシンは細胞によってグアノシンと同様に処理され、AからG（又はTからC）への変化が作出される。

10

【0042】

本明細書において使用する「融合ポリペプチド」又は「融合タンパク質」という用語は、2つ以上のポリペプチド配列を互いに接続することによって作出される、タンパク質を意味する。本発明に包含される融合ポリペプチドは、第一のポリペプチドをコードしている核酸配列、例えばRNA結合ドメインを、第二のポリペプチドをコードしている核酸配列、例えばエフェクタードメインと接続することにより、1つのオープンリーディングフレームを形成した、キメラ遺伝子構築物の翻訳産物を含む。換言すれば、「融合ポリペプチド」又は「融合タンパク質」は、ペプチド結合によって又はいくつかのペプチドを介して接続された、2つ以上のタンパク質の組換えタンパク質である。融合タンパク質はまた、2つのドメイン間のペプチドリンカーも含み得る。

20

【0043】

本明細書において使用する「リンカー」という用語は、2つ以上の実体を接続させるために使用される任意の手段、実体、又は部分を指す。リンカーは、共有結合性リンカーであっても、又は非共有結合性リンカーであってもよい。共有結合性リンカーの例としては、連結される予定の1つ以上のタンパク質又はドメインに共有結合で付着した、共有結合又はリンカー部分を含む。該リンカーはまた、非共有結合、例えば白金原子などの金属中心を通した有機金属結合であってもよい。共有結合のために、様々な官能基、例えばアミド基（カルボン酸誘導体を含む）、エーテル、エステル（有機及び無機エステルを含む）、アミノ、ウレタン、尿素などを使用することができる。連結させるために、ドメインは、酸化、ヒドロキシル化、置換、還元などによって修飾されることにより、カップリングのための部位が与えられてもよい。コンジュゲーションの方法は、当業者には周知であり、本発明に使用するために包含される。リンカー部分は、化学的リンカー部分、又は例えばペプチドリンカー部分（リンカー配列）を含むがこれらに限定されない。RNA結合ドメイン及びエフェクタードメインの機能を有意に減少させない修飾が好ましいことが理解されるだろう。

30

40

【0044】

本明細書において使用するような、本明細書において使用する「連結された」は、2つ以上の実体が付着して1つの実体を形成することを指す。コンジュゲートは、ペプチド低分子コンジュゲート並びにペプチド-タンパク質／ペプチドコンジュゲートの両方を包含する。

【0045】

本明細書において使用する「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸配列内において切断を、例えば二本鎖DNA配列内において一本鎖又は二本鎖の切断を誘導する、タンパク質（すなわち酵素）を含む。

【0046】

50

本明細書において使用する「CRISPR/Casヌクレアーゼ」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）とCas遺伝子によってコードされる関連するヌクレアーゼとを含有している、原核生物DNAのセグメントを指す。細菌では、CRISPR/Cas遺伝子座は、可動遺伝因子（ウイルス、転位因子、及び接合性プラスミド）に対するRNA誘導適応免疫系をコードしている。3種類のCRISPRシステムが同定されている。CRISPRクラスターは、先行する可動因子に相補的な配列であるスペーサーを含有している。CRISPRクラスターは、成熟したCRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）RNA（crRNA）へと転写及びプロセッシングされる。CRISPR/CasヌクレアーゼCas9及びCpf1は、II型及びV型のCRISPR/Casシステムに属し、標的DNAを切断する強力なエンドヌクレアーゼ活性を有する。Cas9は、約20ヌクレオチドの特有の標的配列（スペーサーと呼ばれる）を含有している成熟crRNAと、リボヌクレアーゼIIIにより補助されるプレ-crRNAのプロセッシングのためのガイドとしての役目を果たすトランス活性化低分子RNA（tracrRNA）によって誘導される。crRNA:tracrRNAの二本鎖は、Cas9に指令して、crRNA上のスペーサーと、標的DNA上の相補的な配列（プロトスペーサーと呼ばれる）との間の相補的な塩基対形成を介してDNAに標的化させる。Cas9は、トリヌクレオチド（化膿性連鎖球菌のCas9についてはNGG）のプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）を認識して、切断部位（PAMから3番目又は4番目の上流にあるヌクレオチド）を特定する。

10

20

【0047】

本明細書において使用する「Cas9」又は「Cas9ヌクレアーゼ」という用語は、Cas9タンパク質又はその断片（例えば、Cas9の活性又は不活性なDNA切断ドメイン及び／又はCas9のgRNA結合ドメインを含んでいる、タンパク質）を含んでいる、RNA誘導ヌクレアーゼを指す。Cas9ヌクレアーゼは時に、casn1ヌクレアーゼ又はCRISPR（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）関連ヌクレアーゼとも称される。CRISPRは、可動遺伝因子（ウイルス、転位因子、及び接合性プラスミド）に対する防御をもたらす、適応免疫系である。CRISPRクラスターは、先行する可動因子に相補的な配列であるスペーサーを含有し、そして侵入してくる核酸に標的化する。CRISPRクラスターは、CRISPR RNA（crRNA）へと転写及びプロセッシングされる。II型CRISPRシステムでは、プレ-crRNAの正しいプロセッシングは、トランスにコードされた低分子RNA（tracrRNA）、内因性リボヌクレアーゼ3（rnc）及びCas9タンパク質を必要とする。tracrRNAは、リボヌクレアーゼ3により補助されるプレ-crRNAのプロセッシングのためのガイドとしての役目を果たす。続いて、Cas9/crRNA/tracrRNAは、スペーサーに対して相補的な鎖状又は環状二本鎖DNA標的をエンドヌクレアーゼで切断する。crRNAに相補的な鎖ではない標的鎖がまず、エンドヌクレアーゼで切断され、その後、3'-5'にエキソヌクレアーゼで短縮される。天然では、DNAの結合と切断は典型的には、タンパク質と両方のRNAを必要とする。しかしながら、シングルガイドRNA（「sgRNA」、又は単に「gRNA」）は、crRNA及びtracrRNAの両方の側面が単一のRNA種に取り込まれるように工学操作されていてもよい。例えば、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012) を参照し、この全内容は、参照によりここに援用される。Cas9は、CRISPRリピート配列内の短いモチーフ（PAM又はプロトスペーサー隣接モチーフ）を認識して、自己対非自己を識別することを助ける。Cas9ヌクレアーゼ配列及び構造は当業者には周知であり（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.,

30

40

50

McLaughlin R. E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); “C RISPR 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); 及び “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) を参照し、この各々の全内容が、参照により本明細書に援用される)。Cas9のオルソログが、化膿性連鎖球菌及びストレプトコッカス・サーモフィルス (*S.thermophilus*) を含むがこれらに限定されない、様々な種において記載されている。さらなる適切なCas9ヌクレアーゼ及び配列は、本開示に基づいて当業者には明らかとなり、このようなCas9ヌクレアーゼ及び配列は、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems” (2013) RNA Biology 10:5, 726-737 (この全内容は、参照により本明細書に援用される) に開示された生物及び遺伝子座に由来するCas9配列を含む。いくつかの実施態様では、「Cas9」という用語は、コリネバクテリウム・ウリセランス (*Corynebacterium ulcerans*) (NCBI参照番号: NC_015683.1、NC_017317.1); コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*) (NCBI参照番号: NC_016782.1、NC_016786.1); スピロプラズマ・シルフィディコラ (*Spiroplasma syrophidicola*) (NCBI参照番号: NC_021284.1); プレボテラ・インターメディア (*Prevotella intermedia*) (NCBI参照番号: NC_017861.1); スピロプラズマ・タイワネンセ (*Spiroplasma taiwanense*) (NCBI参照番号: NC_021846.1); ストレプトコッカス・イニエ (*Streptococcus iniae*) (NCBI参照番号: NC_021314.1); ベルリエラ・バルティカ (*Belliella baltica*) (NCBI参照番号: NC_018010.1); サイクロフレクサス・トルキスI (*Psychroflexus torquisI*) (NCBI参照番号: NC_018721.1); ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) (NCBI参照番号: YP_820832.1); リステリア・イノキュア (*Listeria innocua*) (NCBI参照番号: NP_472073.1); カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) (NCBI参照番号: YP_002344900.1); 又は髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) (NCBI参照番号: YP_002342100.1) に由来するCas9を指す。典型的には、Cas9ヌクレアーゼは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む。

【0048】

配列番号2：Cas9配列

10

20

30

40

50

【化 2】

MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA LLFDSGETAEATRLKRTA
 RRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHR LEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIY
 HLRKKLV DSTDKAD LR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENP INA
 SGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTP NFKSNFDLAEDAKLQLSKDTY
 DDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI LLS DILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALV
 RQQLPEKYKEI FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLR KQRTFD
 NGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPY YVGPLARGNSRFAWMTRKSEETIT
 PWNFEVVVDKGASASQSFIERMTNFDK NLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG
 EQKKAIVD LLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKI IKDKDFLDN
 EENEDILEDIVLTTLTFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQ LKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGK
 TILDFLKSDGFANRNFMLIHDD SLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVD
 ELVKV MGRHKPENIVIEARENQTQKGQNSRERMKRIE EGikelGSQILKEHP VENTQLQNEKLY
 LYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVHIVPQSFLKDD SIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMK
 NYWRQLLNAKLITQRKFDNL TKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDK
 LI REVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKK YPKLESEFVYGDYKV
 YDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEI TLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATV
 RKVLSMPQVNIVKKTEV QTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVE
 KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPK YSLFELENGRKRMLASAG
 ELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPE DNEQQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADAN
 LDKVLSAYNKH RDK PIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SIT
 GLYETRIDLSQLGGD

10

20

【0049】

本明細書において使用する「不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼ」という用語は、少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを欠失した、CRISPR/Casヌクレアーゼを指す。

30

【0050】

本明細書において使用する「ニッカーゼ」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、DNA二本鎖の一本鎖のみを切断するエンドヌクレアーゼを指す。したがって、「Cas9ニッカーゼ」という用語は、典型的にはCas9タンパク質の1つのヌクレアーゼドメインを不活性化することによって、Cas9タンパク質から誘導されたニッカーゼを指す。

【0051】

本明細書において使用する「デアミナーゼ」という用語は、脱アミノ化反応を触媒する酵素を指す。いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、シチジン又はデオキシシチジンからウラシル又はデオキシウラシルへの加水分解的な脱アミノ化をそれぞれ触媒する、シチジンデアミナーゼである。いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、アデノシンからイノシンへの加水分解的な脱アミノ化を触媒するアデノシンデアミナーゼであり、このイノシンは細胞によってグアノシンと同様に処理されて、AからG（又はTからC）の変化を作出する。

40

【0052】

本明細書において使用する「ガイドRNA分子」という用語は一般的には、Cas9タンパク質に結合し、Cas9タンパク質を、標的DNA内の特定の位置に標的化させることのできる、RNA分子（又はまとめてRNA分子群）を指す。ガイドRNAは、2つのセグメントを含み得る：DNA標的化ガイドセグメントとタンパク質結合性セグメント。

50

DNA 標的化セグメントは、標的配列に対して相補的である（又は少なくともストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる）ヌクレオチド配列を含む。タンパク質結合性セグメントは、CRISPRタンパク質、例えばCas9又はCas9関連ポリペプチドと相互作用する。これらの2つのセグメントは、同じRNA分子内に位置していても、又は2つ以上の別々のRNA分子内に位置していてもよい。2つのセグメントが別々のRNA分子内にある場合、DNA 標的化ガイドセグメントを含んでいる分子は時に、CRISPR RNA (crRNA) と称されるが、タンパク質結合性セグメントを含んでいる分子は、トランス活性化RNA (tracrRNA) と称される。

【0053】

本明細書において使用する「標的核酸」又は「標的」という用語は、標的核酸配列を含んでいる核酸を指す。標的核酸は、一本鎖であっても、二本鎖であってもよく、しばしば二本鎖DNAである。本明細書において使用する「標的核酸配列」、「標的配列」又は「標的領域」は、本明細書に開示されているようなCRISPRシステムを使用して結合させたい、特定の配列又はその相補体を意味する。

10

【0054】

本明細書において使用する「標的核酸鎖」という用語は、本明細書に開示されているようなガイドRNAとの塩基対形成にかけられる、標的核酸鎖を指す。すなわち、crRNA及びガイド配列とハイブリダイズする標的核酸鎖は、「標的核酸鎖」と称される。ガイド配列とは相補的ではない、標的核酸の他方の鎖は、「非相補鎖」と称される。二本鎖標的核酸（例えばDNA）の場合、各々の鎖は、crRNA及びガイドRNAを設計するための「標的核酸鎖」であり得、これを使用して、適切なPAM部位が存在する限り、本発明の方法を実施することができる。

20

【0055】

本明細書において使用する「ヌクレアーゼではないDNA修飾酵素」という用語は、ヌクレアーゼではないが、DNA分子内に何らかの修飾、例えば突然変異を導入することができる、酵素を指す。

【0056】

本明細書において使用する「シチジンデアミナーゼ」という用語は、シチジン及びデオキシシチジンからそれぞれウリジン及びデオキシウリジンへの不可逆的で加水分解的な脱アミノ化を触媒する酵素を指す。本明細書において使用する「脱アミノ化」という用語は、ある分子からのアミノ基の除去を指す。

30

【0057】

本明細書において使用する「AID」すなわち「活性化により誘導されるシチジンデアミナーゼ」という用語は、APOBECシチジンデアミナーゼ酵素ファミリーに属する酵素を指す。AIDは、活性化B細胞内で発現され、抗体遺伝子をコードしている基礎をなすDNAにおいて点突然変異を作出することによって (Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99(19): 12304-12308 (2002) and Nature, 415(6873): (2002); Petersen-Mart et al., Nature, 418(6893): 99-103 (2002))、体細胞超突然変異 (Muramatsu et al., Cell, 102(5): 553-63 (2000); Revy et al., Cell, 102(5): 565-75 (2000); Yoshikawa et al., Science, 296(5575): 2033-6 (2002)) を惹起するために必要とされる。AIDはまた、クラススイッチ組換え及び遺伝子変換のための必須なタンパク質因子でもある (Muramatsu et al., Cell, 102(5): 553-63 (2000); Revy et al., Cell, 102(5): 565-75 (2000))。

40

【0058】

本明細書において使用する「リボヌクレオタンパク質複合体」又は「リボヌクレオタンパク質粒子」という用語は、ヌクレオタンパク質及びリボ核酸を含んでいる、複合体又は粒子を指す。本明細書において提供されるような「ヌクレオタンパク質」は、核酸（例えばRNA、DNA）に結合することのできるタンパク質を指す。ヌクレオタンパク質がリボ核酸に結合する場合、それは「リボヌクレオタンパク質」と称される。リボヌクレオタンパク質とリボ核酸との間の相互作用は、直接的であっても、例えば共有結合によっても

50

、又は間接的であっても、例えば非共有結合（例えば静電的相互作用（例えばイオン結合、水素結合、ハロゲン結合）、ファンデルワールス相互作用（例えば双極子-双極子、双極子により誘導される双極子、ロンドン分散）、環スタッキング（パイ作用）、疎水性相互作用など）によってもよい。

【0059】

本明細書において使用する「野生型」という用語は、当業者によって理解される技術分野の用語であり、突然変異体形又は変異体形とは区別されるような、天然に存在するような典型的な形の生物、株、遺伝子、又は特徴を意味する。

【0060】

本明細書において使用する「突然変異」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、置換、欠失、又は挿入を指す。「置換」という用語は、特定の位置の特定の

10

アミノ酸残基が除去され、別のアミノ酸残基が、同位置に挿入されることを意味する。「欠失」という用語は、特定のアミノ酸残基が除去されることを意味する。「挿入」という用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、特定のアミノ酸残基の前又は後に挿入されることを意味する。

【0061】

本明細書において使用する「突然変異誘発」という用語は、ポリヌクレオチド配列への突然変異の導入を指す。本発明に従って、突然変異が、抗体の可変ドメインをコードしている標的DNA分子に導入されることにより、体細胞超突然変異を模倣する。

【0062】

本明細書において使用する「変異体」という用語は、第二の組成物（例えば第二の分子、「親」分子とも呼ばれる）に関連する、第一の組成物（例えば第一分子）を指す。変異分子は、親分子に由来し得るか、それから単離され得るか、それに基づき得るか、又はそれと相同であり得る。変異分子は、元来の親分子と全配列の同一性を有していても、又は代替的には、親分子と100%未満の配列同一性を有していてもよい。例えば、配列の変異体は、元来の配列と比較して、配列において少なくとも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%同一である、第二の配列であってもよい。配列同一率は頻繁には、同一率（又は類似率又は相同率）に関して測定され；比率が高ければ高いほど、2つの配列はより類似している。比較のための配列のアラインメント法は、当技術分野において周知である。様々なプログラム及びアラインメントアルゴリズムが、Smith and Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene, 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153, 1989; Corpet et al. Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, 1988; Huang et al., Comp. Appls Biosci., 8:155-165, 1992; 及び Pearson et al., Meth. Mol. Biol., 24:307-31, 1994に記載されている。Altschul et al., Nat. Genet., 6:119-129, 1994は、配列アラインメント法及び相同性の計算の詳細な考察を提示している。例として、アラインメントツールのALIGN (Myers and Miller, CABIOS 4:11-17, 1989) 又はLFATA (Pearson and Lipman, 1988) を使用して、配列比較を実施し得る（インターネットプログラム（登録商標）1996, W. R. Pearson及びバージニア大学、fasta20u63バージョン2.0u63、発売日1996年12月）。ALIGNは、全配列を互いに比較するが、LFATAは、局所的に類似した領域を比較する。これらのアラインメントツール及びそれらのそれぞれの指導書は、例えば、インターネット上のNCSAウェブサイトで見入手可能である。あるいは、約30アミノ酸を超えるアミノ酸配列の比較については、BLAST2配列関数を、デフォルトパラメーターに設定したデフォルトBLOSUM62マトリックスを使用して（ギャップ存在コスト11、及び1残基あたりのギャップコスト

20

30

40

50

1) 採用することができる。短いペプチド (約 30 アミノ酸より短い) をアラインさせる場合、アラインメントは、Blast2 配列関数を使用して、デフォルトパラメーターに設定された PAM30 マトリックス (オープンギャップ 9、伸長ギャップ 1 ペナルティ) を使用して実施されるべきである。BLAST 配列比較システムは、例えば、NCBI ウェブサイトから入手可能である; Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990; Gish. & States, Nature Genet., 3:266-272, 1993; Madden et al. Meth. Enzymol., 266:131-141, 1996; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997; 及び Zhang & Madden, Genome Res., 7:649-656, 1997 も参照されたい。

【0063】

本明細書において使用する「に由来する」という用語は、第一成分 (例えば第一分子) 又は第一成分からの情報を使用して、第二成分 (例えば、第一分子とは異なる第二分子) を単離するか、誘導するか、又は作製する、プロセスを指す。

【0064】

本明細書において使用する「治療有効量」という用語は、任意の医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット／リスク比で疾患を処置するのに十分な量の細胞集団を意味する。本発明の組成物の 1 日総使用量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当の医師によって決断されるであろうことが理解されるだろう。任意の特定の患者についての具体的な治療有効用量レベルは、患者の年齢、体重、全般的な健康状態、性別、及び食事、投与時刻、投与経路、処置期間、細胞集団と組み合わせる又は同時に使用される薬物、並びに医学分野において周知である同様な因子を含む、多種多様な因子に依存するだろう。いくつかの実施態様では、細胞は、まずそれらをそれらの培養培地から収集し、その後、処置有効量での投与に適した培地及び容器システム (「薬学的に許容される」担体) 中で細胞を洗浄及び濃縮することによって製剤化される。適切な注入媒体は、任意の等張媒体製剤、典型的には通常の食塩水、ノルモゾル R (アボット社) 又はプラズマライト A (バクスター社) であり得るが、5%デキストロス水溶液又はリンガー乳酸液を利用してもよい。注入培地に、ヒト血清アルブミンを補充してもよい。組成物中の処置有効量の細胞は、所望の特異性を有する細胞の相対的割合、レシピエントの年齢及び体重、並びに標的化される容態の重症度に依存する。これらの細胞の量は、低くて約 10^3 /kg、好ましくは 5×10^3 /kg; 高くて 10^7 /kg、好ましくは 10^8 /kg であり得る。細胞の数は、そこに含まれる細胞の種類と同様に、該組成物が目的とする最終的な用途に依存するだろう。典型的には、最少用量は、200 万個の細胞/kg である。通常、200 万個～2000 万個の細胞が被験者に注射される。所望の純度は、選別工程を導入することによって達成され得る。本明細書に提供される用途のために、細胞は一般的には、1 リットル以下の容量であり、500 ml 以下であっても、更には 250 ml 又は 100 ml 又はそれ以下であってもよい。臨床的に妥当な細胞の数は、細胞の所望の総量に累積的に同等であるか又は超える、複数回の注入へと配分してもよい。

【0065】

方法:

したがって、本発明の第一の目的は、真核細胞を、(a) 少なくとも 1 つの塩基編集酵素と (b) 塩基編集酵素を、HBG1 又は HBG2 プロモーター内の少なくとも 1 つの標的配列に誘導するための少なくとも 1 つのガイド RNA 分子とからなる遺伝子編集プラットフォームに接触させ、これにより、該プロモーターを編集し、続いて、該真核細胞内のガンマグロビンの発現を増加させる工程を含む、真核細胞内の胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法に関する。

【0066】

いくつかの実施態様では、遺伝子編集プラットフォームは、HBG1 又は HBG2 プロモーター内にいくつかの突然変異を導入するのに適し、これにより、少なくとも 1 つの転写活性化因子の結合部位が、該プロモーターに導入される。いくつかの実施態様では、遺伝子編集プラットフォームは、KLF1、TAL1、又は GATA1 のための新規な転写

10

20

30

40

50

活性化因子の結合部位を導入するのに特に適している。

【0067】

いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、HBG1又はHBG2プロモーター内に-198T>C突然変異を導入し、これにより、KLF1活性化因子はこれでプロモーターに結合することができる。

【0068】

いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、HBG1又はHBG2プロモーター内に-175T>C突然変異を導入し、これにより、TAL1活性化因子はこれでプロモーターに結合することができる。

【0069】

いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、HBG1又はHBG2プロモーター内に-113A>G突然変異を導入し、これにより、GATA1活性化因子はこれでプロモーターに結合することができる。

【0070】

いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集は、HBG1又はHBG2プロモーター内の-200領域を編集するのに特に適し、これにより、LRF抑制因子のための結合部位が破壊される。いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、-201C>T、-200C>T、-197C>T、-196C>T、-195C>T、及び-194C>Tからなる群より選択された少なくとも1つの突然変異を導入し、これにより、LRF抑制因子のための結合部位は破壊される。

【0071】

いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集は、HBG1又はHBG2プロモーター内の-115領域を編集するのに特に適し、これにより、BCL11A抑制因子のための結合部位が破壊される。いくつかの実施態様では、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、-114C>T、-113C>T、-115C>T、及び-116C>Tからなる群より選択された少なくとも1つの突然変異を導入し、これにより、BCL11A抑制因子のための結合部位は破壊される。

【0072】

いくつかの実施態様では、真核細胞は、造血前駆細胞、造血幹細胞（HSC）、多能性細胞（すなわち胚性幹細胞（ES）及び人工多能性幹細胞（iPS））からなる群より選択される。典型的には、真核細胞は、幹細胞の動員から生じる。

【0073】

いくつかの実施態様では、本発明の塩基編集酵素は、不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼを含む。配列認識機序は、不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼと同じである。典型的には、本発明の不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼは、少なくとも1つのRNA結合性ドメインを含む。RNA結合性ドメインは、本明細書で以後に定義されているようなガイドRNA分子と相互作用する。しかしながら、本発明の不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を全く持たない修飾された形である。したがって、不完全なCRISPR/CasヌクレアーゼはガイドRNA分子を特異的に認識し、よって、塩基編集酵素を、その標的DNA配列へと誘導する。

【0074】

いくつかの実施態様では、不完全なCRISPR/Casヌクレアーゼは、核酸への結合親和性及び／又は特異性を高めるために、酵素活性を改変するために、及び／又はタンパク質の別の特性を変化させるために修飾されていてもよい。いくつかの実施態様では、タンパク質のヌクレアーゼドメインは、修飾されていても、欠失していても、又は不活性化されていてもよい。いくつかの実施態様では、該タンパク質は、タンパク質の機能にとって必須ではないドメインを除去するために切断短縮されていてもよい。いくつかの実施態様では、該タンパク質は、RNA結合ドメインの活性を最適化するために切断短縮されているか又は修飾されている。

10

20

30

40

50

【0075】

いくつかの実施態様では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、突然変異CRISPR/Casヌクレアーゼ、すなわち、1つ以上の点突然変異、挿入、欠失、切断短縮を有するタンパク質、融合タンパク質、又はその組み合わせからなる。いくつかの実施態様では、該突然変異体は、RNA誘導DNA結合活性を有するが、そのヌクレアーゼ活性部位の一方又は両方を欠失している。いくつかの実施態様では、該突然変異体は、CRISPR/Casヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列に対して、少なくとも50%の同一率を有するアミノ酸配列を含む。様々なCRISPR/Casヌクレアーゼを本発明に使用することができる。適切なCRISPR/CRISPR/Casヌクレアーゼの非制限的な例としては、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e（又はCasD）、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1（又はCasA）、Cse2（又はCasB）、Cse3（又はCasE）、Cse4（又はCasC）、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4及びCu1966が挙げられる。例えば、国際公開第2014/144761号、国際公開第2014/144592号、国際公開第2013/176772号、米国特許出願公開第2014/0273226号、及び米国特許出願公開第2014/0273233号を参照されたい（その全内容はその全体が参照により本明細書に援用される）。

10

20

【0076】

いくつかの実施態様では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、II型CRISPR-Casシステムに由来する。いくつかの実施態様では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、Cas9タンパク質に由来する。Cas9タンパク質は、とりわけ、化膿性連鎖球菌、ストレプトコッカス・サーモフィルス、連鎖球菌属、ノカルジオブシス・ダソンヴィレイ（*Nocardiosis dassonvillei*）、ストレプトマイセス・プリスティナエスピリス（*Streptomyces pristinaespiralis*）、ストレプトマイセス・ビリドクロモゲネス（*Streptomyces viridochromogenes*）、ストレプトスポランジウム・ロゼウム（*Streptosporangium roseum*）、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス（*Alicyclobacillus acidocaldarius*）、バチルス・シュードミコイデス（*Bacillus pseudomyoides*）、バチルス・セレンチレデュセンス（*Bacillus selenitireducens*）、エキシグオバクテリウム・シビリカム（*Exiguobacterium sibiricum*）、ラクトバチルス・デルブルエッキイ（*Lactobacillus delbrueckii*）、ラクトバチラス・サリバリウス（*Lactobacillus salivarius*）、ミクロシラ・マリナ（*Microscilla marina*）、バークホルデリア・バクテリア（*Burkholderiales bacterium*）、ポラロモナス・ナフタレニボランス（*Polaromonas naphthalenivorans*）、ポラロモナス属（*Polaromonas sp.*）、クロコスファエラ・ワトソニイ（*Crocospaera watsonii*）、シアノテセ属（*Cyanothece sp.*）、ミクロキスティス・エルギノーサ（*Microcystis aeruginosa*）、シネココッカス属（*Synechococcus sp.*）、アセトハロビウム・アラバチカム（*Acetohalobium arabaticum*）、アモニフェックス・デゲンシイ（*Ammonifex degensii*）、カルシセルロシルプトル・ベクシイ（*Caldicelulosiruptor beccii*）、カンジダツス・デサルホルディス（*Candidatus Desulforudis*）、クロストリジウム・ボツリヌム（*Clostridium botulinum*）、クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）、フィネゴルディア・マグナ（*Fingoldia magna*）、ナトラナエロビウス・サーモフィルス（*Natranaerobius thermophilus*）、ペロトマキュラム・サーモプロピオニカム（*Pelotomaculum thermopropionicum*）、アシディチオバチルス・カルダス（*Acidithiobacillus caldus*）、アシディチオバチルス・フェロオキシダンス（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）、アロクロマチウ

30

40

50

ム・ビノスム (*Allochromatium vinosum*)、マリノバクター属 (*Marinobacter* sp.)、ニトロソコッカス・ハロフィルス (*Nitrosococcus halophilus*)、ニトロソコッカス・ワトソニイ (*Nitrosococcus watsoni*)、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス (*Pseudoalteromonas haloplanktis*)、クテノバクター・ラセミフェル (*Ktedonobacter racemifer*)、メタノハロビウム・エベスチガータム (*Methanohalobium evestigatum*)、アナベナ・バリアビリス (*Anabaena variabilis*)、ノデュラリア・スプミゲナ (*Nodularia spumigena*)、ノストック属 (*Nostoc* sp.)、アルトロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*)、アルトロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)、アルトロスピラ属 (*Arthrospira* sp.)、リングピア属 (*Lyngbya* sp.)、ミクロコレウス・クロノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*)、オスキラトリア属 (*Oscillatoria* sp.)、ペトロトガ・モビリス (*Petrotoga mobilis*)、サーモシフォ・アフリカヌス (*Thermosiphon africanus*)、又はアカリオクロリス・マリナ (*Acaryochloris marina*) に由来し得る。

10

【0077】

いくつかの実施態様では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、野生型CRISPR/Casヌクレアーゼ (例えばCas9) の突然変異体又はその断片である。いくつかの実施態様では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、化膿性連鎖球菌に由来する突然変異Cas9タンパク質である。

【0078】

不活性なDNA切断ドメインを有するCas9タンパク質 (又はその断片) を作製する方法は公知である (例えば、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):1173-83参照、これはその各々の全内容が参照により本明細書に援用される)。例えば、Cas9のDNA切断ドメインは、HNHヌクレアーゼサブドメインとRuvC1サブドメインという、2つのサブドメインを含むことが知られている。HNHサブドメインは、gRNAに対して相補的な鎖を切断し、ここでの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ス状態にすることができる。例えば、D10A及びH841Aの突然変異は、化膿性連鎖球菌のCas9のヌクレアーゼ活性を完全に失活させる (Jinek et al., *Science*. 337:816-821(2012); Qi et al., *Cell*. 28; 152(5):1173-83 (2013))。

20

30

【0079】

いくつかの実施態様では、本発明のCRISPR/Casヌクレアーゼはニックアーゼであり、より特定するとCas9ニックアーゼ、すなわち、D10A及びH840Aからなる群より選択された1つの突然変異を有する化膿性連鎖球菌に由来するCas9である。いくつかの実施態様では、本発明のニックアーゼは、配列番号3又は配列番号33に示されるようなアミノ酸配列を含む。

【0080】

配列番号3>D10A突然変異を有する化膿性連鎖球菌のnCas9タンパク質の配列

40

【化 3】

MDKKYSIGL^AIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
 RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
 RKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
 AKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
 NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
 KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVV
 KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL
 FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL
 TLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
 RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
 VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGikelGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL
 DINRLSDYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMKNYWRQLLNAKLITQRKF
 DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDF
 RKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAK
 YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGG
 FSKE SILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
 FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
 EKLKGS PEDNEQQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIH
 LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

10

20

【0081】

配列番号 33 > H840A 突然変異を有する化膿性連鎖球菌の nCas9 タンパク質の
 配列

30

40

50

【化 4】

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
 RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
 RKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLF IQLVQTYNQ LFEENPINASGVD
 AKAILSARLSKSRRLLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL
 NLLAQIGDQYADLF LAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
 KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
 HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVV
 KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL
 FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL
 TLTFLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN
 RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
 VIEMARENQTQKGQKNSRERMKRIE EGikelGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL
 DINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKF
 DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDF
 RKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAK
 YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGG
 FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS
 FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY
 EKLKGS PEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIH
 LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

10

20

【0082】

いくつかの実施態様では、D10A又はH840A以外の突然変異を有するCas9変異体
 が使用され、これにより例えば、ヌクレアーゼの失活したCas9 (dCas9) が
 得られる。このような突然変異としては、例えば、D10及びH840における他のアミ
 ノ酸置換、又は、Cas9のヌクレアーゼドメイン内の他の置換（例えば、HNHヌクレ
 アーゼドメイン及び／又はRuvC1サブドメイン内の置換）が挙げられる。いくつか
 の実施態様では、配列番号2又は配列番号3に対して少なくとも約70%同一であるか、少
 なくとも約80%同一であるか、少なくとも約90%同一であるか、少なくとも約95%
 同一であるか、少なくとも約98%同一であるか、少なくとも約99%同一であるか、少
 なくとも約99.5%同一であるか、又は少なくとも約99.9%同一である、dCas9
 の変異体が提供される。いくつかの実施態様では、配列番号2又は配列番号3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、
 又はそれ以上だけ短いか又は長いアミノ酸配列を有する、dCas9の変異体が提供され
 る。

30

40

【0083】

本発明によると、本明細書において開示された塩基編集酵素の第二成分は、デアミナー
 ゼである、ヌクレアーゼではないDNA修飾酵素を含む。

【0084】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、シチジンデアミナーゼである。いくつか
 の実施態様では、デアミナーゼは、アポリポタンパク質BのmRNA編集複合体 (APOB
 EC) ファミリーのデアミナーゼである。いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、A
 POBEC1ファミリーのデアミナーゼである。いくつかの実施態様では、デアミナーゼ
 は、活性化により誘導されるシチジンデアミナーゼ (AID) である。いくつかの実施態

50

様では、デアミナーゼは A C F 1 / A S E デアミナーゼである。

【0085】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、A I D : 活性化により誘導されるシチジンデアミナーゼ、A P O B E C 1 : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 1、A P O B E C 3 A : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 A、A P O B E C 3 B : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 B、A P O B E C 3 C : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 C、A P O B E C 3 D : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 D、A P O B E C 3 F : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 F、A P O B E C 3 G : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 G、A P O B E C 3 H : アポリポタンパク質 B の m R N A 編集酵素、触媒性ポリペプチド様 3 H、A D A : アデノシンデアミナーゼ、A D A R 1 : R N A 1 に対して作用するアデノシンデアミナーゼ、D n m t 1 : D N A (シトシン-5-) -メチルトランスフェラーゼ 1、D n m t 3 a : D N A (シトシン-5-) -メチルトランスフェラーゼ 3 α 、D n m t 3 b : D N A (シトシン-5-) -メチルトランスフェラーゼ 3 β 、及び T e t 1 : メチルシトシンジオキシゲナーゼからなる群より選択される。

10

【0086】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、活性化により誘導されるシチジンデアミナーゼ (A I D) に由来する。A I D は、D N A 又は R N A の状況においてシトシンの脱アミノ化反応を触媒することのできる、シチジンデアミナーゼである。標的化部位にもたらされると、A I D は、シチジン塩基をウリジン塩基に変化させる。分裂中の細胞では、これは、シトシンからチミジンへの点突然変異に至り得る。あるいは、C から U への変化は、細胞内 D N A 修復経路、主に切断修復経路をトリガーし得、これは、U - G の塩基対のミスマッチを除去し、T - A 対、A - T 対、C - G 対又は G - C 対を用いて置き換えるであろう。結果として、点突然変異が、標的 C - G 部位に生じるだろう。いくつかの実施態様では、D N A 修飾酵素は、A I D * Δ であり、これは核外搬出シグナル (N E S) が除去されている、体細胞超突然変異活性の増加した、A I D 突然変異体である (Hess GT, Fresard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC : Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. Nat Methods 2016, 13(12):1036-1042)。

20

30

【0087】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼである。いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、A D A T ファミリーのデアミナーゼである。例えば、A D A T ファミリーのアデノシンデアミナーゼは、C a s 9 タンパク質、例えばヌクレアーゼ失活 C a s 9 ドメインに融合させることができ、よって、C a s 9 - A D A T 融合タンパク質が生じる。

【0088】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、配列番号 4 ~ 14 に示されるようなアミノ酸配列の変異体からなる。

40

【0089】

配列番号 4 ヒト A I D :

【化 5】

```
MDSLLMNRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKGCHVELLFLRYISDWD
LDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGPNPLSLRIFTARLYFCEDRKAEEPEGLRRLHRAGVQIAI
MTFKDYFYCWNT FVENHERTFKAWEGHLHENSVRSLRQLRRLILLPLYEVDDLRLDAFRTLGL
```

【0090】

配列番号 5 ヒト A P O B E C - 3 G

50

【化6】

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSELKYHPEMR
FFHWFSKWRKLHRDQEYEVWYISWSPCTKCTRDMAFLAEDPKVTLTIFVARLYYFWDPDYQEALRSL
CQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFEFNNLPKYIILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFNFN
NEPWVRGRHETYLCEYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVIPFWKLDLDQD
YRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFRTARIYDDQGRCEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKH
CWDTFVDHQGCPFPQWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN

【0091】

10

配列番号6 ヒトAPOBEC-3F

【化7】

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPRLDAKIFRGQVYSQPEHHAEMC
FLSWFCGNQLPAYKCFQITWFSWTPCPDCVAKLAFLAEHPNVTLTISAARLYYWERDYRRALCRLS
QAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPFMPWYKFDDNYAFLHRTLKEILRNPMEAMYPHIFYFHFKNL
RKAYGRNESWLCFTMEVVKHHSVPWSKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTS
WSPCECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGRLSLSQEGASVEIMGYKDFKYCWENFVY
NDDEPFKPKWGLKYNFLFLDSKLQEILE

20

【0092】

配列番号7 ヒトAPOBEC-3B

【化8】

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKGRSNLLWDTGVFERGQVYFKPQYHAEM
CFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFSWTPCPDCVAKLAFLSEHPNVTLTISAARLYYWERDYRRALCRL
SQAGARVTIMDYEEFAYCWENFVYNEGQQFMPWYKFDDNYAFLHRTLKEILRYLMDPDTFTFNFNNDPL
VLRRTQTYLCEYEVERLDNGTWVLMQHMGLCNEAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRV
WFISWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRRLRIFAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFYCW
DTFVYRQGCFFQPDWGLEEHSQALSGRLRAILQNQEN

30

【0093】

配列番号8 ヒトAPOBEC-3C

【化9】

MNPQIRNPMKAMYPGTFYFQFKNLWEANDRNETWLCFTVEGIKRRSVVSWKTGVFRNQVDSETHCHAER
CFLSWFCDDILSPNTKYQVTWYTSWSPCPDCAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFYQPCYQEGRLSL
SQEGVAVEIMDYEDFKYCWENFVYNDNEPFKPKWGLKTNFRLLKRRLRESLQ

【0094】

40

配列番号9 ヒトAPOBEC-3A

【化10】

MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCEYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGR
HAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFIWSPCFSWGCAGEVRAFLQENTHVRRLRIFAARIYDYDPLYKE
ALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFPQWDGLDEHSQALSGRLRAILQNQEN

【0095】

配列番号10 ヒトAPOBEC-3H

50

【化 1 1】

MALLTAETFRLQFNNKRRLRRPYYPKALLCYQLTPQNGSTPTRGYFENKKKCHAEICFINEIKSMGLD
ETQCYQVTCYLTWSPCSSCAWELVDFIKAHDHLNLGIFASRLYYHWCKPQQKGLRLLCGSQVPVEVMGF
PKFADCWENFVDHEKPLSFNPYKMLEELDKNRAIKRRLERIKIPGVRAQGRYMDILCDAEV

【0096】

配列番号 1 1 ヒト APOBEC - 3 D

【化 1 2】

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFERGPVLPKRQSNHRQ
EVYFRFENHAEMCFLSWFCGNRLPANRRFQITWVFSWNPCLPCVVKVTKFLAEHPNVTLTISAARLYYY
RDRDWRWVLLRLHKAGARVKIMDYEDFAYCWENFVCNEGQPFMPWYKFDDNYASLHRTLKEILRNPMEA
MYPHIFYFHFKNLLKACGRNESWLCFTMEVTKHHSVFRKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDIL
SPNTNYEVTWYTSWSPCECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLCYFWDTDYQEGLCSSLSQEGASVKIMG
YKDFVSCWKNFVYSDDEPFKPKWGLQTNFRLLRRLREILQ

10

【0097】

配列番号 1 2 ヒト APOBEC - 1

【化 1 3】

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFDYDPRELKREACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKK
FTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCWECQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSG
VTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPPLWMMLYALELHCIILSLPPCLKISRRWQNHLTFFR
LHLQNCYQTIPPHILLATGLIHPSVAWR

20

【0098】

配列番号 1 3 ヒト ADAT - 2

【化 1 4】

MEAKAAPKPAASGACSVSAEETEKWMEEAMHMAKEALENTEVPVGCLMVYNNEVVGKGRNEVNQTKNAT
RHAEMVAIDQVLDWCRQSGKSPSEVFHTVLYVTVEPCIMCAAALRLMKIPLVVYGCQNERFGGCGSVL
NIASADLPNTGR PFQCIPGYRAEEAVEMLKTFYKQENPNAPKSKVRKKECQKS

30

【0099】

配列番号 1 4 ヒト ADAT - 1

【化 1 5】

MWTADEIAQLCYEHYGI RLPKKGKPEPNHEWTLAAVVKIQSPADKACDTPDKPVQVTKEVSMGTGTK
CIGQSKMRKNGDILNDSHA EVIARRSFQRYLLHQLQLAATLKEDSIFVPGTQKGVWKLRRDLIFVFFSS
HTPCGDASIIIPMLEFEDQPCCPVFRNWAHNSSVEASSNLEAPGNERKCEDPDSVPTKKMRLEPGTAARE
VTNGAAHHQSFGKQKSGPISP GHIHSCDLTVEGLATVTRIAPGSAKVIDVYRTGAKCVPGEAGDSGKPGA
AFHQVGLLRVKPGRGDRTRSMSCSDKMARWNVLCQGALLMHLLEPIYLSAVVIGKCPYSQEAMQRAL
IGRCQNVSALPKGFGVQELKILQSDLLFEQSRSAVQAKRADSPGRLVPCGA AISWSAVPEQPLDVTANG
FPQGTTKKTIGSLQARSQISKVELFRSFQKLLSRIARDKWPHSLRVQKLDTYQEYKEAASSYQEAWSTL
RKQVFGSWIRNPPDYHQFK

40

【0100】

いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、不完全な CRISPR/Cas ヌクレアー
ゼの N 末端に融合している。いくつかの実施態様では、デアミナーゼは、不完全な CRI

50

S P R / C a s ヌクレアーゼのC末端に融合している。いくつかの実施態様では、不完全なC R I S P R / C a s ヌクレアーゼとデアミナーゼは、リンカーを介して融合している。いくつかの実施態様では、該リンカーは、(G G G G S) n (配列番号3)、(G) n、(E A A A K) n (配列番号4)、(G G S) n、SGSETPGTSESATPES (配列番号5) のモチーフを含む (例えば、Guilinger J P, Thompson D B, Liu D R 参照)。追加の適切なリンカーモチーフ及びリンカー構造は、当業者には明らかであろう。いくつかの実施態様では、適切なリンカーモチーフ及びリンカー構造は、Chen et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65(10):1357-69 (その全内容が参照により本明細書に援用される) に記載のものが挙げられる。

10

【0101】

いくつかの実施態様では、融合タンパク質は、追加の特色を含み得る。存在し得る他の例示的な特色は、局在化配列、例えば核局在化配列 (N L S)、細胞質局在化配列、搬出配列、例えば核外搬出配列、又は他の局在化配列、並びに、融合タンパク質の可溶化、精製又は検出に有用である配列タグである。適切な局在化シグナル配列及びタンパク質タグの配列は本明細書において提供され、これには、ビオチンカルボキシラーゼ担体タンパク質 (B C C P) タグ、m y c タグ、カルモジュリンタグ、F L A G タグ、ヘマグルチニン (H A) タグ、ポリヒスチジンタグ (ヒスチジンタグ又は H i s タグとも称される)、マルトース結合タンパク質 (M B P) タグ、n u s タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T) タグ、緑色蛍光タンパク質 (G F P) タグ、チオレドキシントグ、S タグ、S o f t a g (例えば S o f t a g 1、S o f t a g 3)、ストレプトアビジンタグ、ビオチン系統タグ、F I A S H タグ、V 5 タグ、及びストレプトアビジン結合性ペプチドタグが挙げられるがこれらに限定されない。追加の適切な特色は、当業者には明らかとなる。

20

【0102】

様々な塩基編集酵素が、当技術分野において公知であり (例えば、Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29 参照)、そしてこれには典型的には表 A に記載のものが含まれる。

【0103】

30

40

50

【表 1】

表A:いくつかの例示的な塩基編集酵素

塩基編集酵素	参考文献
ABEmax	Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29. pii: nbt.4172. doi: 10.1038/nbt.4172.
AncBE4max	Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29. pii: nbt.4172. doi: 10.1038/nbt.4172.
evoCDA1-BE4max-NG	Continuous evolution of base-editing enzymes with expanded target compatibility and improved activity. Nat Biotechnol. 2019 Jul 22. pii: 10.1038/s41587-019-0193-0. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0.
evoFERNY-BE4max	Continuous evolution of base-editing enzymes with expanded target compatibility and improved activity. Nat Biotechnol. 2019 Jul 22. pii: 10.1038/s41587-019-0193-0. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0.
CBE-NRCH	Miller SM, Wang T, Randolph PB, Arbab M, Shen MW, Huang TP, Matuszek Z, Newby GA, Rees HA, Liu DR. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. Nat Biotechnol. 2020 Apr;38(4):471-481. doi: 10.1038/s41587-020-0412-8. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32042170; PMCID: PMC7145744.
CBE-SpG	Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science. 2020 Apr 17;368(6488):290-296. doi: 10.1126/science.aba8853. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32217751; PMCID: PMC7297043.
CBE-SpRY	Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science. 2020 Apr 17;368(6488):290-296. doi: 10.1126/science.aba8853. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32217751; PMCID: PMC7297043.
ABE8e	Richter MF, Zhao KT, Eton E, Lapinaite A, Newby GA, Thuronyi BW, Wilson C, Koblan LW, Zeng J, Bauer DE, Doudna JA and Liu DR. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. Nat. Biotechnol. 2020 Mar 38, 883–891. 1780 doi: 10.1038/s41587-020-0453-z

10

20

30

40

【0104】

本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームの第二成分は、塩基編集酵素を、HBG1又はHBG2プロモーター内に位置する少なくとも1つの標的配列に誘導するのに適した少なくとも1つのガイドRNA分子からなる。したがって、本発明のガイドRNA分子は、標的化特異性をもたらすためのガイド配列を含む。それは、HBG1又はHBG2プロモーター内の関心のある予め選択された標的部位に対して相補的でありかつハイブリダイズすることのできる、領域を含む。

【0105】

いくつかの実施態様では、このガイド配列は、約10ヌクレオチドから約25を超える

50

ヌクレオチドを含み得る。例えば、ガイド配列と対応する標的部位配列の間の塩基対形成領域は、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、又は25を超えるヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施態様では、ガイド配列は、約17～20ヌクレオチド長、例えば20ヌクレオチド長である。

【0106】

典型的には、ソフトウェアプログラムを使用して、所望のガイド配列長及び特定のCRISPR酵素のためのCRISPRモチーフ配列(PAM)に基づき、HBG遺伝子を含むDNA核酸分子の両鎖上で候補CRISPR標的配列を同定する。適切な標的核酸を選択するための1つの必要条件是、それが3' PAM部位／配列を有することである。各標的配列及びその対応するPAM部位／配列は本明細書においてCas標的化部位と称される。最もよく特徴付けられたシステムの1つであるII型CRISPRシステムは、標的の切断を起こすために、Cas9タンパク質と、標的配列に相補的なガイドRNAのみを必要とする。例えば、PAM配列NGGを有する、化膿性連鎖球菌に由来するCas9の標的部位は、インプット配列上及びインプット配列の逆相補体上の両方で5'-Nx-NGG-3'を探索することによって同定され得る。ゲノム内にDNA標的部位が複数存在することにより、非特異的なゲノムの編集がなされる可能性があるため、全ての可能性ある部位を同定した後、プログラムが、関連する参照ゲノム内に出現する回数に基づいて配列をフィルター除去する。配列の特異性が、PAM配列それ自体を含む、PAM配列から5'側の11～12bpなどの「シード」配列によって決定されるCRISPR酵素のための、フィルタリング工程は、シード配列に基づき得る。したがって、追加のゲノム遺伝子座での編集を回避するために、結果を、関連するゲノム内のシード：PAM配列の出現数に基づいてフィルターする。ユーザーは、シード配列の長さを選択することを許可され得る。ユーザーはまた、フィルターを通過させる目的のために、ゲノム内のシード：PAM配列の出現数を特定することを許可され得る。デフォルトは、特有の配列についてスクリーニングするためである。フィルターレベルは、シード配列の長さでゲノム内の配列の出現数の両方の変化によって変化する。プログラムは、追加して又は代替的に、同定された標的配列(群)の逆相補体を提供することによって、報告された標的配列(群)に対して相補的なガイド配列の配列を提供し得る。配列の選択を最適化するための方法及びアルゴリズムのさらなる詳細は、米国特許出願第61／836,080号に見られ得、これは参照により本明細書に援用される。

【0107】

いくつかの実施態様では、塩基編集酵素及び対応するガイドRNA分子は、表Bに従って選択される。

【0108】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 B : 塩基編集酵素とガイドRNA分子との間の適切な対形成

目標／標的	選択された塩基編集酵素	選択されたガイドRNA分子	gRNAの名称
KLF1及びTAL1のための結合部位の作出	ABEmax	AUAAUUUGCAUUGAGAUAGUG (TAL1) (配列番号:48) GUGGGGAAGGGGCCCAAG (KLF1) (配列番号:49)	TAL1_bs_1 KLF1_bs_1
BCL11A結合部位の破壊	AncBE4max	CUUGACCAAUAGCCUUGACA (配列番号 :50)	BCL11A_bs_1
	ABEmax	CUUGACCAAUAGCCUUGACA (配列番号 :50)	BCL11A_bs_1
	evoCDA1-BE4max-NG	1: CUUGACCAAUAGCCUUGACA (配列番号 :50) 4: UUGACCAAUAGCCUUGACAAGG (配列番号 :51)	BCL11A_bs_1 BCL11A_bs_2
	evoFERNY-BE4max-NG	1: CUUGACCAAUAGCCUUGACA (配列番号 :50) 4: UUGACCAAUAGCCUUGACAA (配列番号 :51)	BCL11A_bs_1 BCL11A_bs_2
LRF結合部位の破壊	evoCDA1-BE4max-NG	CCUUCCCCACACUAUCUCAA (配列番号 :52)	LRF_bs_1
	evoFERNY-BE4max-NG	CCUUCCCCACACUAUCUCAA (配列番号 :52)	LRF_bs_1
	AncBE4max_NAA	GCCCCUCCCCACACUAUCU (配列番号 :53)	LRF_bs_2
	CBE-NRCH	CCUUCCCCACACUAUCUCAA (配列番号 :52)	LRF_bs_1
	CBE-SpG	CCUUCCCCACACUAUCUCAA (配列番号 :52)	LRF_bs_1
	CBE-SpRY	CCUUCCCCACACUAUCUCAA (配列番号 :52)	LRF_bs_1
	CBE-SpRY	GCCCCUCCCCACACUAUCU (配列番号 :53)	LRF_bs_2
	ABE8e	GUGGGGAAGGGGCCCAAG (KLF1) (配列番号:49)	KLF1_bs_1

【0109】

本発明のガイドRNA分子は、細胞に基づいた発現、インビトロでの転写、及び化学合成を含む、当技術分野において公知である様々な方法によって作製され得る。末端継続RNA (TC-RNA) 化学反応 (例えば米国特許第8,202,983号参照) を使用した比較的長いRNA (200mer以上もの長さ) を化学合成できることにより、基本的な4つのリボヌクレオチド (A、C、G及びU) によって可能となるRNAよりも優れている特殊な特色を有するRNAを作製することが可能となる。特に、本発明のRNA分子は、当技術分野において公知である宿主細胞系又はインビトロでの翻訳-転写系を使用した組換え技術を用いて作製され得る。このような系及び技術の詳細は、例えば、国際公開

第2014/144761号、国際公開第2014/144592号、国際公開第2013/176772号、米国特許出願公開第2014/0273226号及び米国特許出願公開第2014/0273233号に見られ得、これらの内容のその全体が参照により本明細書に援用される。

【0110】

いくつかの実施態様では、ガイドRNA分子は、1つ以上の修飾を含み得る。このような修飾は、少なくとも1つの非天然ヌクレオチド、又は修飾されたヌクレオチド、又はその類似体の包含を含み得る。修飾されたヌクレオチドは、リボース、リン酸塩、及び／又は塩基部分において修飾されていてもよい。修飾されたヌクレオチドは、2'-O-メチル類似体、2'-デオキシ類似体、又は2'-フルオロ類似体を含み得る。核酸骨格は、修飾されていてもよく、例えばホスホロチオエート骨格が使用され得る。ロックド核酸（LNA）又は架橋核酸（BNA）の使用も可能であり得る。修飾された塩基のさらなる例としては、2-アミノプリン、5-ブロモウリジン、シュードウリジン、イノシン、7-メチルグアノシンが挙げられるがこれらに限定されない。

【0111】

いくつかの実施態様では、複数のガイドRNA分子が、HBG1又はHBG2プロモーター内の複数の配列に標的化するように設計される。いくつかの実施態様では、したがって、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、本明細書において開示されているような、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個又は20個のガイドRNA分子を含む。

【0112】

いくつかの実施態様では、複数の塩基編集酵素は、複数のガイドRNA分子と共に、HBG1又はHBG2プロモーター内の複数の配列に標的化するように設計される。いくつかの実施態様では、したがって、本明細書において開示された遺伝子編集プラットフォームは、2個、3個、又は4個の塩基編集酵素、及び本明細書において開示されているような2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個又は20個のRNA分子を含む。

【0113】

いくつかの実施態様では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの様々な成分が、1つ以上の発現ベクターからの発現を通して真核細胞に提供される。例えば、ガイドRNA分子又は塩基編集酵素をコードしている核酸を、それらを真核細胞に導入するための1つ以上のベクターにクローニングすることができる。ベクターは典型的には、本明細書において開示されたガイドRNA分子又は塩基編集酵素をコードしている核酸の保存又は操作のための、原核細胞ベクター、例えばプラスミド、又はシャトルベクター、又は挿入ベクターである。好ましくは、核酸は、単離及び／又は精製されている。したがって、本発明は、上記の1つ以上のガイドRNA分子又は塩基編集酵素をコードしている配列を有する組換え構築物又はベクターを提供する。構築物の例としては、ベクター、例えばプラスミド又はウイルスベクターが挙げられ、これに本発明の核酸配列が正方向に又は逆方向に挿入されている。いくつかの実施態様では、該構築物は更に、調節配列を含む。「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御配列（例えばポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列は、核酸配列並びに誘導性調節配列の恒常的な発現を指令する配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換、トランスフェクト又は感染させる予定の真核細胞の選択、所望の発現レベルなどのこのような因子に依存し得る。多くの適切なベクター及びプロモーターが当業者に公知であり、市販されている。真核細胞宿主で使用するのに適したクローニングベクター及び発現ベクターは、Sambrook et al. (2001, 分子クローニング：実験マニュアル、コールドスプリングハーバー出版)にも記載されている。ベクターは、自律複製できるか、又は宿主DNAに組み込むことができる。ベクターはまた、発現を増幅するのに適切な配列も含んでいてもよい。更に、発現ベクターは好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型特質、例えば真核細胞培養液用のジ

ヒドロ葉酸還元酵素若しくはネオマイシン耐性、又はE. coliにおけるテトラサイクリン若しくはアンピシリン耐性などをもたらす、1つ以上の選択マーカー遺伝子を含む。外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するための当技術分野において公知である任意の手順を使用し得る。例は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、電気穿孔法、ヌクレオフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション、裸DNA、プラスミドベクター、ウイルスベクター（エピソーム及び組込み型の両方）、及びクローニングされたゲノムDNA、cDNA、合成DNA、又は他の外来遺伝子物質を宿主細胞に導入するための他の周知の方法のいずれかの使用を含む。

【0114】

いくつかの実施態様では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの様々な成分が、RNAによりコードされるシステムの使用を通して、細胞集団に提供される。例えば、塩基編集システムは、Jiang, T., Henderson, J.M., Coote, K. et al. Chemical modifications of adenine base editor mRNA and guide RNA expand its application scope. Nat Commun 11, 1979 (2020)に記載のような修飾されたガイドRNAと一緒に、化学的に修飾されたmRNAによりコードされるアデニン又はシチジン塩基エディターの使用を通して、細胞集団に提供され得る。特に、工学操作されたRNAによりコードされる塩基編集酵素（例えばABE）システムは、様々な化学的修飾を、塩基編集酵素とガイドRNAをコードする両方のmRNAに導入することによって調製される。特に、該修飾は、5-メトキシウリジンで修飾されたウリジンの欠失したmRNAからなる。同義コドンを、コード配列を変化させることなく、できるだけ多くのウリジンを欠失させるために導入し得、そして5-メトキシウリジンを用いて残りの全てのウリジンを置換し得る。前記の最適化された塩基編集システムは、DNAによりコードされるシステムと比較して、いくつかのゲノム部位においてより高い編集効率を示す。脂質ナノ粒子（LNPs）媒介性送達を可能とするための脂質ナノ粒子（LNPs）に、修飾されたmRNA及びガイドRNAを封入することも可能である。

【0115】

いくつかの実施態様では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの様々な成分が、リボヌクレオタンパク質（RNP）複合体の使用を通して、細胞集団に提供される。例えば、塩基編集酵素は、1つ以上のガイドRNA分子と予め複合体を形成することにより、リボヌクレオタンパク質（RNP）複合体を形成することができる。よって、RNP複合体を、真核細胞に導入することができる。RNA複合体の導入は、時刻を設定できる。細胞は、細胞周期のG1期、S期、及び／又はM期で他の細胞と同調させることができる。RNP送達は、mRNA、DNA、又はウイルスによる送達に伴う多くの落とし穴を回避する。典型的には、RNA複合体は単に、タンパク質（すなわち塩基編集酵素）及び1つ以上のガイドRNA分子を適切な緩衝液中で混合することによって作製される。この混合物を、電気穿孔前に、室温で5～10分間インキュベートする。電気穿孔法は、電場を1つ以上の細胞にかけ、細胞膜の透過性を増加させる、送達技術である。いくつかの実施態様では、遺伝子編集効率は、トランスフェクション増強オリゴヌクレオチドの添加によって改善され得る。

【0116】

いくつかの実施態様では、複数回の連続的なトランスフェクションが、細胞内の所望のレベルの突然変異誘発に到達するために実施される。

【0117】

本発明のさらなる目的は、必要とする被験者における胎児ヘモグロビンレベルを増加させるための方法に関し、該方法は、上記のような方法によって得られた真核細胞集団の治療有効量を移植する工程を含む。

【0118】

いくつかの実施態様では、細胞集団は、被験者に対して自己であり、このことは、細胞集団が同じ被験者に由来することを意味する。

【0119】

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様では、被験者は、ヘモグロビン異常症と診断されている。したがって、本発明の方法は特に、ヘモグロビン異常症の処置に適している。

【0120】

いくつかの実施態様では、 β -ヘモグロビン異常症は鎌状赤血球症である。

【0121】

いくつかの実施態様では、ヘモグロビン異常症は、 β -サラセミアである。

【0122】

キット

本発明は更に、突然変異誘発を実施するために本明細書において開示されているような遺伝子編集プラットフォームの全ての成分を含む、上記方法を実施するための試薬を含有している、キットを提供する。この目的を達成するために、反応成分の1つ以上、例えばガイドRNA分子、及び本明細書に開示されている方法のための塩基編集酵素をコードしている核酸分子は、使用のためにキットの形態で供給され得る。いくつかの実施態様では、該キットは、1つ以上の塩基編集酵素と1つ以上のガイドRNA分子を含む。いくつかの実施態様では、該キットは、1つ以上の他の反応成分を含み得る。いくつかの実施態様では、適切な量の1つ以上の反応成分が、1つ以上の容器内に提供されるか、又は基剤上に保たれる。キットの追加の成分の例は、1つ以上の宿主細胞、外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入するための1つ以上の試薬、ガイドRNA若しくは塩基編集酵素の発現を検出するための又は標的核酸の状態を確認するための1つ以上の試薬（例えばプローブ又はPCRプライマー）、及び反应用の緩衝液又は培養培地を含むがこれらに限定されない。該キットはまた、以下の1つ以上の成分も含み得る：支持試薬、終結試薬、修飾試薬、又は消化試薬、浸透圧調節物質、及び検出用器具。使用される成分は、様々な形態で提供され得る。例えば、該成分（例えば酵素、RNA、プローブ及び／又はプライマー）は、水溶液中に懸濁されていても、又はフリーズドライさせた若しくは凍結乾燥させた粉末、ペレット、又はビーズとしてでもよい。後者の場合、該成分は、復元されると、アッセイで使用するための成分の完全な混合物を形成する。本発明のキットは、任意の適切な温度で提供され得る。例えば、液体中にタンパク質成分又はその複合体を含有しているキットの保存では、それらは0℃未満、好ましくは-20℃若しくはそれ未満で、又はさもなければ凍結状態で提供及び維持されることが好ましい。該キットはまた、容器又は容器の組合せを入れるための梱包材料を含み得る。このようなキット及びシステムのための典型的な包装材料は、多種多様な構造（例えばバイアル、マイクロタイタープレートのウェル、マイクロアレイなど）のいずれかに、反応成分又は検出用プローブを入れる、固体マトリックス（例えばガラス、プラスチック、紙、ホイル、微粒子など）を含む。該キットは更に、実体のある形で記録された成分の使用説明書を含んでいてもよい。

【0123】

本発明を更に、以下の図面及び実施例によって説明する。しかしながら、これらの実施例及び図面は、いかなる方法でも、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきものではない。

【実施例】

【0124】

実施例：

方法：

細胞株の培養

K562を、グルタミンを含有し、10%ウシ胎児血清（ロンザ社）、2mMのHepes（ライフテクノロジーズ社）、100nMのピルビン酸ナトリウム（ライフテクノロジーズ社）、及びペニシリンとストレプトマイシン（ライフテクノロジーズ社）の補充された、RPMI1640（ロンザ社）中で維持した。HUDEP-2細胞を、1 μ g/mLのドキシサイクリン（シグマ社）、10⁻⁶Mのデキサメタゾン（シグマ社）、100ng/mLのヒト幹細胞因子（SCF）（ペプロテック社）、3IU/mLのエリスロポエチン（Necker Hospital Pharmacy社）、L-グルタミン（ライフテクノロジーズ社）及

びペニシリン／ストレプトマイシンの補充された、StemSpan SFEM（ステムセルテクノロジー社）中で培養した。HUDEP-2細胞を、330 µg/mLのホロトランスフェリン（シグマ社）、10 µg/mLの組換えヒトインシュリン（シグマ社）、2 IU/mLのヘパリン（シグマ社）、5 %ヒトAB型血清、3 IU/mLのエリスロポエチン、100 ng/mLのヒト幹細胞因子、1 µg/mLのドキシサイクリン、1 %のL-グルタミン、及び1 %ペニシリン／ストレプトマイシンの補充されたイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）（ライフテクノロジー社）中で9日間かけて分化させた。CD36、CD71、及びGYPA表面マーカーのフローサイトメトリーによる分析、並びに標準的なメイ・グリュンワルドギムザ染色を実施して、赤芽球分化をモニタリングした。

【0125】

HSPCの精製及び培養

本発明者らは、ヒト臍帯血（CB）CD34⁺HSPCを健康なドナーから、及び動員されていないヒト末梢血CD34⁺HSPCをSCD患者から入手した。研究目的のための適格な臍帯血試料は、セントルイス病院（パリ、フランス）の臍帯血バンクから慣例により入手した。研究目的のための適格なSCD試料は、慣例により、「ネッケル小児病院」という病院（パリ、フランス）から入手した。書面によるインフォームドコンセントを、全ての成人被験者から得た。全ての実験は、ヘルシンキ宣言に従って実施された。研究は、地域試験審査委員会（リファレンス番号：DC2014-2272、CPP Ile-de-France II、「ネッケル小児病院」）によって承認された。HSPCは、CD34マイクロビーズキット（ミルテニーバイオテク社）を用いた免疫染色後、AutoMACS（ミルテニーバイオテク社）を用いた免疫磁気による選択によって精製された。トランスフェクションの48時間前に、CD34⁺細胞（10⁶個の細胞/ml）を解凍し、ペニシリン／ストレプトマイシン（ギブコ社）、250 nMのStemRegenin1（ステムセルテクノロジー社）及び以下の組換えヒトサイトカイン（ペプロテック社）：ヒト幹細胞因子（SCF）（300 ng/ml）、Flt-3L（300 ng/ml）、トロンボポエチン（TPO）（100 ng/ml）、及びインターロイキン-3（IL-3）（60 ng/ml）の補充されたStemSpan（ステムセルテクノロジー社）を含有している「HSPC培地」中で培養した。

【0126】

プラスミド

この研究に使用されたプラスミドとしては、pCMV__ABEmax__P2A__GFP（アドジーン社112101番）、pCMV__AncBE4max__P2A__GFP（アドジーン社112100番）、pBT374（アドジーン社125615番）、pBT372（アドジーン社125613番）、pCMV-ABEmaxAW（アドジーン社125647番）、pMJ（アドジーン社42234番）、ABE8e（アドジーン社138489番）、pCMV-BE4max-NRCH（アドジーン社136920番）、pCAG-CBE4max-SpG-P2A-EGFP（RTW4552）（アドジーン社139998番）及びpCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFP（RTW5133）（アドジーン社139999番）が挙げられる。AncBE4max__NAAプラスミドは、SpCas9のPAM相互作用ドメインを、SmaCas9の1つで置換することによって作出されたが、一方、プラスミドAncBE4max__R33A/K34Aは、R33A及びK34Aの突然変異を、AncBE4maxプラスミド（アドジーン社112094番）のAPOBEC1ドメインに挿入することによって作出された。HBB遺伝子の2コピーの3'非翻訳領域（UTR）と96個のアデニンのポリA配列とを含有しているDNA断片（3'UTR+ポリA）は、ジェンスクリプト社（遺伝子合成）によって購入された。同様に、ウリジンの欠失したpCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFPのコード配列を含有しているDNA断片を作製した（CBE-SpRY__U-de lp）。CBE-SpRY-OPTプラスミドは、3'UTR+ポリA断片をpCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFPに挿入し、そしてCBE4max-SpRYをCBE-SpRY__U-de lp断片で置換することによって作製され

10

20

30

40

50

た。更に、本発明者らは、CBE-SpRYプラスミドのCAG合成プロモーターを、T7プロモーターで置換した。ABE-SpRY-OPTプラスミドは、3'UTR+ポリA断片をpCMV-T7-ABEmax(7.10)-SpRY-P2A-EGFP(RTW5025)(アドジーン社、140003番)に挿入することによって作出された。
【0127】

gRNAの設計

gRNAの発現プラスミドの構築のために、オリゴヌクレオチドをアニーリングさせて、gRNAのプロトスペーサーを作出し、二本鎖をBbsIで消化されたMA128プラスミド(フランス、Genethon社のM. Amendolaによって提供)にライゲートした。
【0128】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 1. gRNAの標的配列

gRNA	標的配列 (5'から3')	位置(hg19)	鎖
TAL1_bs_1	ATATTTGCATTGAGATAGTGT GG (配列番号 :15)	第 11 番染色体: 5271260- 5271279 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276184- 5276203 (<i>HBG2</i>)	+
KLF1_bs_1	GTGGGGAAGGGGCCCCCAAG AGG (配列番号 :16)	第 11 番染色体: 5271279- 5271298 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276203- 5276222 (<i>HBG2</i>)	+
BCL11A_bs_1	CTTGACCAATAGCCTTGACA AGG (配列番号 :17)	第 11 番染色体: 5271188- 5271207 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276112- 5276131 (<i>HBG2</i>)	-
BCL11A_bs_2	TTGACCAATAGCCTTGACA AGG (配列番号 :18)	第 11 番染色体: 5271187- 5271206 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276111- 5276130 (<i>HBG2</i>)	-
LRF_bs_1	CCTTCCCCACACTATCTCAAT G (配列番号 :19)	第 11 番染色体: 5271269- 5271288 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276193- 5276212 (<i>HBG2</i>)	-
LRF_bs_2	GCCCCTTCCCCACACTATCT CAA (配列番号 :20)	第 11 番染色体: 5271272- 5271291 (<i>HBG1</i>) 第 11 番染色体: 5276196- 5276215 (<i>HBG2</i>)	-

PAMモチーフは太字で強調されている。

【0129】

mRNAのインビトロでの転写

10 μgのCBE-SpRY-OPT、ABE-SpRY-OPT又はABE8eを発現しているプラスミドを、一晩かけて、ポリAテイルの直後で一回切断する20単位の制限酵素を用いて消化した(CBE-SpRYではAflII、ABE8eではABE-SpRY及びSapI)。鎖状化プラスミドを、PCR精製キット(キアゲン社、28106番)を使用して精製し、30 μlのDNase/RNaseフリー水中で溶出した。1 μgの鎖状化プラスミドを、インビトロでの転写反応のための鋳型として使用した(MEG Ascript、アンピオン社、AM1334番)。インビトロ転写プロトコールは以下のよう

に改変された。GTPヌクレオチド溶液を、7.5 mMの代わりに3.0 mMの最終濃度で使用し、抗リバースキャップアナログN7-メチル-3'-O-メチル-グアノシン-5'-トリホスフェート-5'-グアノシン (ARCA、Trilink社、N-7003番) を、mRNAの効率的なキャッピングを可能とする、4:1のキャップ:GTPの最終比をもたらす、最終濃度12.0 mMで使用した。インビトロでの反応のためのインキュベーション時間は、30分まで短縮された。デオキシヌクレアーゼIによる処理後 (MEGAscript、アンビオン社、AM1334番)、ABE8e mRNAに、製造業者のプロトコールに従ってポリAテイルを付加した (ポリAテイルキット、アンビオン社、AM1350番)。mRNAを、塩化リチウムを使用し沈降させ、1 µg/µl以上の濃度を達成することを可能とした最終容量のTE緩衝液中に再懸濁した。mRNAの品質を、バイオアナライザ (アジレント社) を使用して確認した。

10

【0130】

プラスミドのトランスフェクション

K562細胞及びHUDEP-2細胞 (10⁶個の細胞/条件) を、3.6 µgの塩基編集酵素を発現しているプラスミド及び1.2 µgのgRNA含有プラスミドを用いてトランスフェクトした。GFPを発現していない塩基編集酵素プラスミドのために、本発明者らは、250 ngのGFPmaxを発現しているプラスミド (ロンザ社) をコトランスフェクトした。本発明者らは、K562及びHUDEP-2について、それぞれ、AMAXA細胞株ヌクレオフェクターキットV (VCA-1003) 並びにU-16及びL-29プログラム (ヌクレオフェクターII) を使用した。K562細胞では、トランスフェクション効率は、Fortessa X20 (BDバイオサイエンス社) フローサイトメーターを使用して、トランスフェクションから18時間後にフローサイトメトリーによって評価され、細胞は、少なくとも3日間は培養液中に維持され、3日目にゲノムDNA抽出を実施した。GFP⁺HUDEP-2細胞を、SH800細胞選別機 (ソニーバイオテクノロジー社) を使用して、トランスフェクションから18時間後に選別し、選別された細胞を培養液中で増殖させた。トランスフェクションから3日間に、ゲノムDNAの抽出を実施した。CD34⁺HSPC (10⁶個の細胞/条件) を、3.6 µgの酵素を発現しているプラスミド及び2.4 µgのgRNA含有プラスミドを用いてトランスフェクトした。GFPを発現していない塩基編集酵素プラスミドについては、本発明者らは、250 ngのGFPmax発現プラスミド (ロンザ社) をコトランスフェクトした。本発明者らは、AMAXAヒトCD34細胞ヌクレオフェクターキット (VPA-1003) 及びU-08プログラム (ヌクレオフェクターII) を使用した。トランスフェクションから18時間後、GFP⁺CD34⁺HSPCを、SH800細胞選別機 (ソニーバイオテクノロジー社) を使用して選別し、500,000/mLの濃度でサイトカインの濃縮されたHSPC培地 (上記) 中に少なくとも6日間かけて播種し、その後、ゲノムDNAの抽出を実施したか、又は、3相の赤芽球分化プロトコール (Weber, Frati Science Advances 2020) を20日間まで使用して成熟RBCに分化させた。ゲノムDNAの抽出を6日目に実施し、全RNAの抽出を13日目に実施し、HbFの発現を評価するための機能的分析 (フローサイトメトリー、RP-HPLC、CE-HPLC、及び鎌状化アッセイ) を19日目に実施した。

20

30

40

【0131】

RNAのトランスフェクション

K562細胞 (2×10⁵個の細胞/条件) を、2.0 µgの一塩基エディターを発現しているmRNA、及びSynthego社から購入した化学的修飾 (最初の3個の塩基と最後の塩基における2'-O-メチル、最初の3個の塩基と最後の2個の塩基との間の3'ホスホロチオエート結合) を含有している合成gRNAを用いて、1.5 µMの最終濃度でトランスフェクトした。本発明者らは、P3 Primary Cell 4D-ヌクレオフェクターXキットS (ロンザ社) 及びCA137プログラム (ヌクレオフェクター4D) を使用した。TE緩衝液でトランスフェクトされた細胞は、陰性対照としての役目を果たした。RNAのトランスフェクトされたK562細胞は、ゲノムDNA抽出及び塩基編集分析前に、少

50

なくとも3日間、培養液中で維持された。

【0132】

CD34⁺HSPC (2×10⁵個の細胞/条件)に、3.0 μgの一塩基エディター発現mRNA、及びSynthego社から購入した化学的修飾(最初の3個の塩基と最後の塩基における2'-O-メチル、最初の3個の塩基と最後の2個の塩基との間の3'ホスホロチオエート結合)を含有している合成gRNAを用いて、4.6 μMの最終濃度でトランスフェクトした。本発明者らは、P3 Primary Cell 4D-ヌクレオフェクターXキットS(ロンザ社)及びCA137プログラム(ヌクレオフェクター4D)を使用した。TE緩衝液で、又は塩基エディターmRNAのみで、又は塩基エディターmRNA及びAAVS1遺伝子座に標的化するgRNAでトランスフェクトされた細胞は、陰性対照としての役目を果たした。RNAのトランスフェクトされたHSPCを、HSPC培地(上記)中500,000個/mLの濃度で播種し、ゲノムDNA抽出及び塩基編集分析の前に少なくとも6日間培養した。

10

【0133】

編集効率の評価

ゲノムDNAは、K562細胞及びHUDEP2細胞についてはトランスフェクションから3日後、及びCD34⁺HSPCではトランスフェクションから6日後に、製造業者の説明書に従って、PURE LINKゲノムDNAミニキット(ライフテクノロジーズ社)を使用して、対照細胞及び編集された細胞から抽出した。gRNA標的部位における塩基編集効率を評価するために、本発明者らは、PCR、それに続いて、サンガーシーケンス及びEditR分析(EditR:サンガーシーケンスから塩基編集を定量する方法)を実施した⁽²⁷⁾。TIDE分析(Tracking of Indels by Decomposition)も、塩基編集試料における挿入及び欠失(インデル)の比率を評価するために実施された⁽²⁸⁾。

20

【0134】

【表4】

表2. 塩基編集及びインデル事象を検出するのに使用されるプライマー

増幅領域	F/R	配列(5'から3')
HBG1+HBG2プロモーター	F	AAAAACGGCTGACAAAAGAAGTCCTGGT AT(配列番号:21)
	R	ATAACCTCAGACGTTCCAGAAGCGAGTGT G(配列番号:22)

30

【0135】

デジタルドロップレットPCR(ddPCR)を、EvaGreenミックス又はプライマー/プローブミックス(バイオラッド社)を使用して実施して、HBG1-HBG2介在領域I又はIIをそれぞれ増幅することによって、4.9 kbの欠失の出現頻度を定量した。短い(約1分間)伸長時間は、欠失を有するゲノム領域のPCRによる増幅を可能とした。同じ染色体(第11番染色体)又はヒトアルブミン(hALB)(第4番染色体)上のゲノム領域にアニーリングする対照プライマーを、DNAローディング対照としてそれぞれ使用した。

40

【0136】

50

【表 5】

表3. ddPCRのために使用されるプライマー

増幅領域	F/R	配列 (5'から3')
HBG1-HBG2 介在領域 I	F	GTTTTAAAACAACAAAAATGAGGGAAA GA (配列番号 :23)
	R	GTTGCTTTATAGGATTTTTCACAC (配列番号 :24)
第 11 番染色体の対照領域	F	CCCTTCCGAGAGGATTTAGG (配列番号 :25)
	R	AGTCGGGATCTGAACAATGG (配列番号 :26)
HBG1-HBG2 介在領域 II	F	ACGGATAAGTAGATATTGAGGTAAGC (配列番号 :54)
	R	GTCTCTTTCAGTTAGCAGTGG (配列番号 :55)
ヒトアルブミン	F	ACTCATGGGAGCTGCTGGTT (配列番号 :56)
	R	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTG 配列番号 :57)

F, 正方向プライマー; R, 逆方向プライマー

【0137】

フローサイトメトリー分析

分化した H U D E P - 2 を、BD Cytofix/Cytoperm 溶液 (B D フェーミンゲン社) を使用して固定及び透過処理を行ない、H b F (アロフィコシアニン (A P C) にコンジュゲートした抗 H b F 抗体、M H F 0 5、ライフテクノロジーズ社) を認識する抗体で染色した。C D 3 6、C D 7 1 及び G Y P A 赤血球系表面マーカーのフローサイトメトリー分析は、V 4 5 0 にコンジュゲートさせた抗 C D 3 6 抗体 (5 6 1 5 3 5、B D H o r i z o n)、F I T C にコンジュゲートさせた抗 C D 7 1 抗体 (5 5 5 5 3 6、B D P h a r m i n g e n)、及び P E - C y 7 にコンジュゲートさせた抗 G Y P A 抗体 (5 6 3 6 6 6、B D P h a r m i n g e n) を使用して実施された。対照細胞及び編集された H S P C から分化した S C D R B C を、0.05% のグルタルアルデヒドで固定し、0.1% トリトン X - 1 0 0 を用いて透過性処理を行ない、H b F を認識する抗体 (F I T C にコンジュゲートさせた抗 H b F 抗体、クローン 2 D 1 2 5 5 2 8 2 9 B D) で染色した。C D 3 6、C D 7 1、G Y P A、B A N D 3 及び $\alpha 4$ - インテグリン赤血球系表面マーカーのフローサイトメトリーによる分析は、V 4 5 0 にコンジュゲートさせた抗 C D 3 6 抗体 (5 6 1 5 3 5、B D H o r i z o n)、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) にコンジュゲートさせた抗 C D 7 1 抗体 (5 5 5 5 3 6、B D P h a r m i n g e n)、フィコエリトリン-シアニン 7 (P E - C y 7) にコンジュゲートさせた抗 G Y P A 抗体 (5 6 3 6 6 6、B D P

harmingen)、フィコエリトリンにコンジュゲートさせた抗BAND3抗体(9439、IBGRL)、及びアロフィコシアニンにコンジュゲートさせた抗CD49d抗体(559881、BD社)を使用して実施された。DRAQ5(除核)及び7AAD(生存率)のフローサイトメトリーによる分析は、抗二本鎖DNA色素(それぞれ、65-0880-96、インビトロジェン社、及び559925、BD社)を使用して実施された。フローサイトメトリー分析は、FortessaX20(BDバイオサイエンシズ社)又はガリオスフローサイトメーターを使用して実施された。データは、FlowJo(BDバイオサイエンシズ社)又はKALUZAソフトウェアを使用して分析された。

【0138】

コロニー形成細胞(CFC)アッセイ

HSPCを、メチルセルロース含有培地(GFH4435、ステムセルテクノロジーズ社)中 1×10^3 個の細胞/mLの濃度で、赤芽球及び顆粒球分化を支持する条件下で播種した。赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)及び顆粒球マクロファージコロニー形成細胞(CFU-GM)のコロニーを14日後にスコアリングした。BFU-E及びCFU-GMを無作為に拾い上げ、バルク集団(少なくとも30個のコロニーを含有している)として収集して、陽イオン交換-高速液体クロマトグラフィー(CE-HPLC)によるヘモグロビンの発現を評価した。

【0139】

グロビン転写物のRT-qPCR分析

全RNAを、製造業者の説明書に従って、RNeasyマイクロキット(キアゲン社)を使用して、HUDEP-2細胞(分化の0日目、6日目、及び9日目)、及びSCDHSPCから分化(13日目)した赤血球系細胞から抽出した。成熟した転写物は、オリゴ(dT)プライマーを用いたRT-qPCR(インビトロジェン社)のためのSuperscript First-Strand Synthesis Systemを使用して逆転写された。RT-qPCRは、iTaqユニバーサルSYBRグリーンマスターミックス(バイオラッド社)及びViia7リアルタイムPCRシステム(サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を使用して実施された。

【0140】

【表6】

表4. RT-qPCRのために使用されたプライマー

増幅領域	F/R	配列(5'から3')
HBA	F	CGGTCAACTTCAAGCTCCTAA (配列番号:27)
	R	ACAGAAGCCAGGAAGTTGTC (配列番号:28)
HBB	F	GCAAGGTGAACGTGGATGAAGT (配列番号:29)
	R	TAACAGCATCAGGAGTGGACAGA (配列番号:30)
HBG1+HBG2	F	CCTGTCCTCTGCCTCTGCC (配列番号:31)
	R	GGATTGCCAAAACGGTCAC (配列番号:32)

F, 正方向プライマー; R, 逆方向プライマー

【0141】

グロビン鎖のRP-HPLCによる分析

RP-HPLC分析を、NexeraX2SIL-30ACクロマトグラフ及びLC solutionソフトウェア(島津)を使用して実施した。グロビン鎖は、 250×4.6 mm、 $3.6 \mu\text{m}$ のAeris Widedporeカラム(フェノメネクス社)を使用してHPLCによ

って分離した。試料を、溶液 A（水／アセトニトリル／トリフルオロ酢酸、95：5：0.1）及び溶液 B（水／アセトニトリル／トリフルオロ酢酸、5：95：0.1）の勾配混合物を用いて溶出した。吸光度は 220 nm で測定された。

【0142】

ヘモグロビン四量体の C E - H P L C 分析

陽イオン交換 H P L C 分析を、Nexera X2 SIL-30AC クロマトグラフ及び LC Solution ソフトウェア（島津）を使用して実施した。ヘモグロビン四量体は、2 つの陽イオン交換カラム（ポリキャット A、ポリエルシー社、コロンビア、メリーランド州）を使用して H P L C によって分離した。試料を、溶液 A（20 mM のピストリス、2 mM の K C N、p H 6.5）と溶液 B（20 mM のピストリス、2 mM の K C N、250 mM の N a C l、p H = 6.8）の勾配混合物を用いて溶出した。吸光度は 415 nm で測定された。

10

【0143】

鎌状化アッセイ

赤芽球分化の終了時に、S C D H S P C に由来する成熟 R B C を、低酸素条件（0 % 酸素）下でインキュベートし、鎌状化の経緯を、AxioObserver Z1 顕微鏡（ツァイス社）及び 40 倍の対物レンズを使用して、20 分間毎に少なくとも 60 分間画像を撮影しながら、ビデオ顕微鏡によってリアルタイムでモニタリングした。同じ視野の画像が、全ての段階を通して撮影され、ImageJ で処理することにより、全 R B C 集団における 1 つの取得された視野あたりの非鎌状化 R B C の比率を決定した。1 つの条件あたり 400 個を超える細胞を計数した。

20

【0144】

結果：

H B G プロモーターにおける効率的な塩基編集により、T A L 1 及び K L F 1 の転写活性化因子のための結合部位が新規に生じる

- 175 T > C H P F H 突然変異は、T A L 1 転写活性化因子を H B G プロモーターにリクルートすることが示されており⁽⁶⁾、一方、- 198 T > C H P F H 突然変異は、K L F 1 転写活性化因子をリクルートする⁽⁷⁾。本発明者らは、H B G プロモーター内の - 175 位及び - 198 位における塩基に標的化することのできる、g R N A（T A L 1 __ b s __ 1 及び K L F 1 __ b s __ 1）（図 1）を使用した。これらの g R N A のための、標的塩基は、それぞれ 3 位及び 7 位にある。K 562 赤白血病細胞株を、A B E m a x __ G F P プラスミド及び T A L 1 __ b s __ 1 又は K L F 1 __ b s __ 1 g R N A プラスミドを用いてトランスフェクションすることにより、バルク細胞集団においてそれぞれ 61.0 % 及び 30.3 % の効率で A > G 変換（反対の鎖では T > C）がもたらされた（図 2 A、2 B 及び 2 Q）。

30

【0145】

T A L 1 及び K L F 1 の結合部位の発生により、γ-グロビンの脱抑制がもたらされる

K 562 細胞は主に、γ-グロビンを発現し、この理由のために、それらは γ-グロビンの脱抑制を測定するためのモデルとしては使用できない。したがって、本発明者らは、T A L 1 及び K L F 1 の活性化因子の結合部位の作出後の γ-グロビンの脱抑制を評価するために、H U D E P - 2 成人赤血球系前駆細胞株を使用した。A B E m a x __ G F P プラスミド及び T A L 1 __ b s __ 1 又は K L F 1 __ b s __ 1 g R N A プラスミドのいずれかを用いた、プラスミドによるトランスフェクション後、G F P + H U D E P 2 細胞を選別し、増幅した。塩基編集効率は、- 175 位及び - 198 位においてそれぞれ 65 % 及び 45 % であった（図 3 A、3 B 及び 3 J）。対照細胞及び編集された細胞を、成熟赤血球に分化した。- 175 位及び - 198 位において編集された細胞のフローサイトメトリー分析により、高い出現頻度の H b F 発現細胞が判明し（分化の 0 日目に 76.0 % 及び 80.3 %、並びに分化の 9 日目に 85.0 % 及び 88.1 %）、一方、A B E m a x __ G F P プラスミドのみでトランスフェクトされた対照集団では、H b F 発現細胞は約 3.0 % であった（図 4 A）。したがって、本発明者らは、γ-グロビン転写物の産生増加、及

40

50

び平行した成人 β -グロビンmRNAの減少を観察した(図4B)。逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)は、 γ -グロビンの有意な増加と、同時に起こる β -グロビンの産生減少を確認した(図4C)。TAL1及びKLF1の結合部位の発生により、陽イオン交換HPLC(CE-HPLC)によって決定したところ、全Hbのそれぞれ最大で53.5%及び30.0%まで占める高いHbFレベルがもたらされた(図4D)。HBG1/2プロモーターの塩基編集は、赤血球系マーカーのGYPA、CD36及びCD71のフローサイトメトリーによる分析によって評価されるように、赤血球系細胞の分化を変化させなかった(図4E~4G)。

【0146】

HBGプロモーターの-115領域における塩基編集により、BCL11A転写抑制因子の結合部位が破壊され、同時にGATA1転写活性化因子の結合部位が生じる

HBGプロモーターの-115領域上のHPFH突然変異は、BCL11A転写抑制因子の結合部位を破壊することによって(-114C>T)、又はGATA1転写活性化因子の結合部位を作出することによって(-113A>G)、上昇したHbFの発現を引き起こす。本発明者らは、これらのHPFH突然変異(-114C>T及び-113A>G)及び追加のHPFH様突然変異(-116A>G及び-115C>T)を作出するために、ABE又はCBEのいずれかによって使用され得る、gRNA(BCL11A__bs__1及びBCL11A__bs__2)を設計した(図1)。標的塩基は、基準の塩基編集窓に該当する。特に、-116、-115、-114及び-113塩基は、それぞれgRNA BCL11A__bs__1及びBCL11A__bs__2について5~8位及び4~7位にある。ABEmax__GFP及びgRNA BCL11A__bs__1プラスミドを用いたK562細胞株のトランスフェクション後、本発明者らは、-116位及び-113位においてA>Gの変換を得ることに成功した(それぞれ40.7%及び34.3%)(図2C及び2Q)。AncBE4max__GFPプラスミドを用いた同じgRNA BCL11A__bs__1プラスミドのトランスフェクションにより、-115位及び-114位においてC>Tの変換がなされた(それぞれ34.8%及び28.5%)(図2D及び2Q)。BCL11A転写抑制因子の結合部位を破壊するための酵素の選択肢を増やす試みにおいて、本発明者らは、BCL11A結合部位(BCL11A__bs__1及びBCL11A__bs__2)に標的化する2つのgRNAと組み合わせて、NGPAMを認識する2つの酵素である、evoCDA1-BE4max-NG又はevoFERNY-BE4max-NGプラスミドを用いて、K562細胞株をトランスフェクトした。4つ全ての異なる組合せにより、同じC>Tの変換がもたらされ(-115C>T及び-114C>T)、効率は18~40.5%の範囲であった(evoCDA1-BE4max-NG-BCL11A__bs__1; 40.5%の-115C>T、及び31.5%の-114C>T、evoCDA1-BE4max-NG-BCL11A__bs__2; 30.0%の-115C>T、及び22.0%の-114C>T、evoFERNY-BE4max-NG-BCL11A__bs__1; 22.0%の-115C>T、及び21.5%の-114C>T、及びevoFERNY-BE4max-NG-BCL11A__bs__2; 18.0%の-115C>T、及び19.0%の-114C>T)(図2E、2F及び2Q)。

【0147】

NGGを含まない塩基エディターは、複数の塩基を編集し、そしてHPFH及びHPFH様突然変異を作出することによって、LRF転写抑制因子の結合部位を破壊することができる

HBGプロモーターの-200領域は、成人期における高度な γ -グロビン発現に関連した、様々なHPFH突然変異を含有している。これらの大半の突然変異は、その結合部位の破壊を介して、LRF転写抑制因子の結合能を減少させることによって、HBG遺伝子を脱抑制する。LRF結合部位には、8つのシトシンがあり、理論的にはそれらの全てが、チミンに変換されるために、塩基編集によって標的化され得る。結果として、多数のHPFH突然変異、及びLRF結合能を損なうことによってHPFH様表現型を誘導し得

る追加の突然変異を作出することができる（図1）。LRF結合部位に近い基準のSpCas9 NGG PAMが存在しないことは、この部位の編集を可能とするNGGを含まないCas9変異体を含む塩基編集酵素の作製を本発明者らに促した。Cas9のこの変異体は、LRF結合部位の標的化にとって理想的なNAA PAMを認識する。なぜなら、それは、2～11位に標的塩基（8つのシトシン）を配置する、gRNA（LRF__bs__2）の設計を可能とするからである。PAM相互作用性ドメインの交換後、結果として得られた酵素（AncBE4max__NAAと呼ばれる）を、LRF__bs__2 gRNAプラスミドと組み合わせて、K562細胞株にプラスミドとしてトランスフェクトした。本発明者らは、最大37.0%の効率で、LRF結合部位の8個のシトシンの中の7個を修飾することができた（8.7%の-202C>T；20.3%の-201C>T；37.0%の-200C>T；30.7%の-197C>T；27.7%の-196C>T；16.3%の-195C>T；5.7%の-194C>T）（図2G及び2Q）。evoCDA1-BE4max-NG又はevoFERNY-BE4max-NGの酵素を使用して、LRF結合部位に標的化するための、1つ以上のgRNA（LRF__bs__1）が設計された（図1）。これらの組合せを用いて、本発明者らは、モチーフの8個のシトシンの中の6個を標的化することができ、これらの6個のシトシンは、1～8位にある。LRF__bs__1 gRNAプラスミドと、evoCDA1-BE4max-NG又はevoFERNY-BE4max-NGのいずれかの酵素を使用した、K562細胞株のトランスフェクションにより、evoCDA1-BE4max-NG酵素では8.0～28.5%（8.0%の-201C>T；22.5%の-200C>T；28.0%の-197C>T；27.5%の-196C>T；28.5%の-195C>T；21.0%の-194C>T）、evoFERNY-BE4max-NG酵素では15.0～32.5%の範囲である効率（28.0%の-197C>T；32.5%の-196C>T；25.5%の-195C>T；15.0%の-194C>T）が判明した（図2H、2I及び2Q）。同じgRNAを、より効率的なNGGを含まない塩基エディター、例えばCBE-NRCH、CBE-SpG及びCBE-SpRYを用いて試験した。LRF__bs__1 gRNAと組み合わせた場合、CBE-NRCH、CBE-SpG及びCBE-SpRYにより、K562細胞へのプラスミドのトランスフェクション時に、それぞれ最大50.3%、43.7%、及び46.3%までのC>Tの効率をもたらされた（図2J～L及び2Q）。CBE-SpRYのPAMがない性質を考えると、この塩基エディターをLRF__bs__2 gRNAと組み合わせ、そして上記の全ての酵素より優れ、58.0%の効率に達した。重要なことには、その幅広い編集窓のお陰で、CBE-SpRYは、-200領域の全てのシトシンを変換した（図2M及び2Q）。最後に、ABE8e酵素プラスミドを、KLF1__bs__1 gRNAと共にK562細胞にコトランスフェクトし、これにより最大で72.7%までの効率で、-198 A:T bp及び-199 A:T bpの両方のA>G修飾がもたらされ、その結果、LRFの結合部位は破壊された（図2N及び2Q）。

【0148】

塩基編集によるBCL11A及びLRF転写抑制因子の結合部位の破壊により、HbFは再活性化される

HPFH及びHPFH様突然変異を作出することによって、HBGプロモーターの-115及び-200領域に標的化するための、以前に報告された塩基編集アプローチを、BCL11A及びLRF転写抑制因子結合部位の破壊後、並びに／あるいはGATA1転写活性化因子の結合部位の作出後、γグロビンの脱抑制を評価するために、HUDEP-2細胞株において試験した。両方の領域について、4つの異なる酵素（ABEmax__GFP、AncBE4max__GFP、evoCDA1-BE4max-NG及びevoFERNY-BE4max-NG）を発現しているプラスミドを、単一のgRNA発現プラスミド（BCL11A__bs__1、BCL11A__bs__2、LRF__bs__1及びLRF__bs__2）と組み合わせてHUDEP-2細胞に個々にトランスフェクトした。GFPを発現しないプラスミドについては（evoCDA1-BE4max-NG及びevo

FERNY-BE4max-NG)、少量のGFPmax発現プラスミドをコトランスフェクトした。トランスフェクション後、GFP⁺細胞をFACSで選別し、培養液中で増幅し、赤血球に分化させた。

【0149】

ABEmax__GFP酵素及びBCL11A__bs__1 gRNAを用いたBCL11A結合部位の編集により、それぞれ56.0%及び57.0%の頻度で、-116A>G及び-113A>Gの変換がなされ、BCL11A結合部位が破壊され、同時にGATA1結合部位が作出された(図3C及び3J)。BCL11A__bs__1 gRNAと組み合わせたAncBE4max__GFP酵素を使用して、本発明者らは、HPFH(38.0%の-114C>T)及びHPFH様(47.0%の-115C>T)突然変異の作製に成功した(図3D及び3J)。BCL11A__bs__1又はBCL11A__bs__2 gRNAのいずれかと組み合わせた、NGGを含まないPAM酵素(evoCDA1-BE4max-NG及びevoFERNY-BE4max-NG)による塩基編集は、evoCDA1-BE4max-NGを使用した場合にのみ効果的であり、これにより、BCL11A__bs__1 gRNAを用いると-115C>T及び-114C>Tの変換(それぞれ40.0%及び27.0%)が、及びBCL11A__bs__2 gRNAを用いると-115C>T及び-114C>Tの変換(それぞれ24.0%及び15.0%)がなされた(図3E、3F及び3J)。上記酵素を用いたBCL11A結合部位の塩基編集は、赤血球系マーカーのGYPA、CD36及びCD71のフローサイトメトリーによる分析によって評価したところ、赤血球系の分化には影響を及ぼさなかった(図5A~5C)。フローサイトメトリー分析は、HbF発現細胞の増加した出現頻度を示した(最大87.8%まで)(図5D)。RT-qPCR分析により、フローサイトメトリーデータと一致して、上昇したγ-グロビン転写物の産生と、同時に起こるβ-グロビン転写物の産生減少が判明した(図5E)。RP-HPLC及びCE-HPLC分析はこれらのデータを確認し、HbFは、全Hbの最大31.8%までを占めた(図5F~5G)。

【0150】

LRF抑制因子の結合部位に標的化するために、LRF__bs__1 gRNAと組み合わせた、evoCDA1-BE4max-NG及びevoFERNY-BE4max-NG酵素の使用により、evoCDA1-BE4max-NG酵素では最大24.0%までの塩基編集効率が(4.0%の-201C>T; 24.0%の-197C>T; 23.0%の-196C>T; 23.0%の-195C>T; 17.0%の-194C>T)、そしてevoFERNY-BE4max-NG酵素では最大20.0%までの塩基編集効率(20.0%の-197C>T; 20.0%の-196C>T; 5.0%の-195C>T; 1.0%の-194C>T)がもたらされ(図3G、3H及び3J)、同時にHbF発現細胞はそれぞれ12.9%(編集されていない対照細胞では3.5%)及び21.4%(編集されていない対照細胞では6.7%)まで増加した(図6A)。その後、本発明者らは、初代臍帯血由来のCD34⁺造血幹/前駆細胞(HSPC)を使用した。CD34⁺細胞に、AncBE4max__NAA、LRF__bs__1 gRNA及びGFPmaxプラスミドをトランスフェクトし、GFPの発現について選別した。細胞は液体培養液中に維持されたか、又は赤芽球及び顆粒球-単球前駆細胞の増殖及び分化を可能とする半固形培地に蒔いた(コロニー形成単位アッセイ)。トランスフェクションから6日後、本発明者らは、液体培養液中で19.0%の-200C>Tの変換効率を得た(図6B~6C)。トランスフェクションから14日後、陽イオン交換HPLC分析を実施して、赤芽球前駆細胞に由来する赤芽球バースト形成細胞(BFU-E)コロニーにおけるヘモグロビン四量体を検出した(図6D)。この分析は、11.02%のHbFレベルの増加を明らかにとした(対照試料では68.22%、編集された試料では79.24%)(図6D)。要するにこれらのデータは、新規AncBE4max__NAA塩基編集酵素が、初代HSPCにおけるLRF転写抑制因子の結合部位に標的化することができ、それらの赤芽球前駆細胞におけるHbFの発現を増加させることができることを示す。

【0151】

インデル及び大きな欠失は、塩基の編集された細胞ではほとんど検出不可能であった

C R I S P R / C a s 9ヌクレアーゼの使用と共に出現する安全性問題の1つは、二本鎖切断の発生後のゲノム内に挿入及び欠失（インデル）の作出である。しかし塩基編集システムを用いると本発明者らはこの問題を克服することができる。なぜなら、塩基エディターは失活したC a s 9ヌクレアーゼを含有しているからである。本発明者らは、本発明者らが使用した塩基編集酵素を用いて、ゲノム内の二本鎖切断を作出していないことを確認したかった。この理由のために、本発明者らは、P C Rによって標的領域を増幅し、塩基の編集された試料及び対照K 5 6 2試料について、サンガーシーケンス、それに続いてT I D E分析を実施した⁽²⁸⁾（図2 O、3 I及び図6 B）。殆ど全ての試料について、本発明者らは、それぞれ18.4%及び22.0%のインデルの平均値を示した、A B E 8 eとK L F 1__b s__1 g R N Aプラスミド、及びe v o C D A 1-B E 4 m a x - N GとL R F__b s__2 g R N Aプラスミドを用いてトランスフェクトされた細胞を除いて、インデルを全く検出しなかった（図2 O）。

10

【0152】

C a s 9ヌクレアーゼを用いてβ-グロビン遺伝子座を編集する場合に生じる別の問題は、同一のH B G 1 / 2プロモーターの同時切断であり、これにより、介在している4.9 k bのゲノム領域の欠失及びH B G 2遺伝子の消失が起こる。それ故、本発明者らは、4.9 k bの欠失が、塩基の編集されたK 5 6 2細胞において存在するかどうかを試験した。塩基の編集された試料のインデルプロファイルに従って（図2 O）、本発明者らは、A B E m a x -、A B E 8 e -及びe v o F E R N Y - B E 4 m a x - N Gで処理された試料においてのみ、低い頻度の4.9 k bの欠失を観察した（それぞれ4.9%、4.9%、及び3.2%；図2 P）。4.9 k bの欠失についての陽性対照として、本発明者らは、基準のC a s 9ヌクレアーゼを用いて編集されたK 5 6 2細胞から抽出されたD N Aを使用した（図2 P）。

20

【0153】

低いRNAオフターゲット活性を有する酵素を使用して、H B G抑制因子及び活性化因子の結合部位に標的化することができる

塩基編集酵素は、殆どがg R N Aに非依存性である、細胞内R N Aのオフターゲット編集を引き起こす可能性がある。塩基編集酵素のデアミナーゼの突然変異は、R N Aのオフターゲット編集を最小限にすることができる。アデニン塩基エディターでは、これらの突然変異は、T a d Aドメイン内のE 5 9 A、及びT a d A*ドメイン内のV 1 0 6 Wであり、これらの突然変異を有する酵素はA B E m a x A Wと呼ばれる⁽²⁹⁾。シトシン塩基エディターについての突然変異は、A P O B E C 1ドメイン内のR 3 3 A及びK 3 4 Aである⁽³⁰⁾。これらの突然変異をA n c B E 4 m a x 酵素に挿入することによって、本発明者らは、A n c B E 4 m a x__R 3 3 A / K 3 4 A塩基編集酵素を作出した。本発明者らの目的は、低いRNAオフターゲット編集を示すこれらの酵素を使用して、T A L 1及びK L F 1活性化因子の結合部位を作出することができるかどうか、又はB C L 1 1 A抑制因子の結合部位を破壊することができるかどうかを確認することであった。A B E m a x A Wプラスミド及びT A L 1__b s__1又はK L F 1__b s__1 g R N Aプラスミドを用いたK 5 6 2細胞のトランスフェクションにより、それぞれ25.0%及び17.0%の頻度で、-175 T>C（反対の鎖に対してA>G）及びT>C（反対の鎖に対してA>G）の変換が行なわれた（図7 A及び7 B）。B C L 1 1 A__b s__1 g R N Aと組み合わせたA B E m a x A Wを用いたB C L 1 1 A結合部位の標的化は、36.0%の-116 A>G及び33.0%のA>Gの変換を引き起こしたが（図7 C）、一方、同じg R N A及びA n c B E 4 m a x__R 3 3 A / K 3 4 A酵素を用いたこの部位の標的化により、それぞれ29.0%及び24.0%の頻度で、-115 C>T及び-114 C>Tの変換がもたらされた（図7 D）。要するに、これらのデータは、これらのより安全な形の塩基編集酵素を使用することにより、H B Gプロモーター内の転写活性化因子又は抑制因子の結合部位に効率的に標的化することができることを実証する。

30

40

【0154】

50

S C D H S P Cにおける、C B Eによる、H B Gプロモーター内のL R F抑制因子の結合部位の破壊は、H b Fの再活性化をもたらす、鎌状化表現型を救出する

S C Dの処置のための治療戦略としての本発明者らの塩基編集アプローチの有効性を証明するために、本発明者らは、塩基エディターを発現しているプラスミド及びg R N Aを発現しているプラスミドを、動員されていない初代ヒト成人S C D H S P Cにトランスフェクトした。特に、C B E酵素を発現しているプラスミド（C B E－N R C H、C B E－S p G－G F P、C B E－S p R Y－G F P）を、単一のg R N A発現プラスミド（L R F__b s__1、L R F__b s__2）と組み合わせて個々にトランスフェクトした。編集された細胞を濃縮するために、本発明者らは塩基エディター－G F P融合体（C B E－S p G－G F P、C B E－S p R Y－G F P）を発現するプラスミドを使用したか、又は本発明者らは、塩基エディターを発現しているプラスミド（C B E－N R C H）及びG F P m a xを発現しているプラスミドをコトランスフェクトした。赤血球系統に向けて分化したG F P 高い細胞を、3相プロトコールを使用して、F A C Sにより選別した。

【0155】

塩基編集効率を、赤血球系分化の第一相の終了時（6日目）に赤芽球において測定した。L R F結合部位における4つのシトシン（L R F 4 C）を変換する、C B E及びL R F__b s__1 g R N Aで処理された試料は、約22.4%（C B E－N R C H、C B E－S p G及びC B E－S p R Yを用いてそれぞれ26.8%、23.8%及び16.5%）の編集効率を示した（図8A）。C B E－S p R Yで及びL R F__b s__2で処理された試料では、L R F結合部位の全てのシトシンが、最大25.5%までの効率でチミジンに変換された（図8B）。塩基の編集された試料のT I D E分析は、インデルの存在しないことを確認した（図8C）。

【0156】

その後、本発明者らは、編集された赤芽球のバルク集団を、成熟したR B Cへと分化させて、H b Fの発現及び鎌状化細胞の表現型の回復を評価した。赤血球系分化は、分化に沿って、後期（C D 3 6、C D 7 1及び α 4－インテグリン）及び初期（G Y P A及びB A N D 3）赤血球系マーカーのフローサイトメトリーによる分析によって測定したところ、対照試料とC B Eで処理された試料の間で類似していた（データは示されていない）。除核速度は、分化中の様々な時点における群間で類似し、最後の相の終了時には全ての試料において90%以上に到達した（データは示されていない）。L R F 4 C及びL R F 8 CのC B Eで処理された試料は、R T－q P C R、R P－H P L C（図8D及び8E）及びC E－H P L C（編集された試料及び対照試料においてそれぞれ22.3%及び9.1%のH b F、図8F）によって測定したところ、m R N A及びタンパク質のレベルの両方において胎児ヘモグロビンの再活性化を示した。フローサイトメトリー分析は、高い頻度のH b F発現R B Cを明らかとした（それぞれ、対照試料、L R F 4 C試料及びL R F 8 C試料において42.9%、64.3%及び70.0%；図8G）。鎌状化表現型に対するH b Fの再活性化の作用を評価するために、本発明者らは、成熟したR B Cを、H b S重合を誘導する低酸素条件下でインキュベートした。興味深いことには、L R F結合部位の4又は8つのシトシンの編集が、鎌状化表現型を寛解した（対照試料、L R F 4 C試料及びL R F 8 C試料においてそれぞれ、23.2%、52.5%及び58.4%の非鎌状化細胞）（図8H）。全体的に、これらのデータは、C B EによるH B G 1／2プロモーターの塩基編集が、H b Fの再活性化をもたらす得、そしてS C D患者のH S P Cから分化したR B Cの鎌状化表現型を救出することを実証する。

【0157】

S C D H S P CにおけるA B Eによる、H B Gプロモーターにおける、L R F抑制因子の結合部位の破壊、又はK L F 1活性化因子の作出により、H b Fの活性化が起こり、鎌状化表現型は救出される

A B Eはまた、L R F転写抑制因子の結合部位を破壊するために、又はK L F 1転写活性化因子の結合部位を作出するために使用され得る。本発明者らは、A B Eの治療能を実証するために、動員されていない初代ヒト成人S C D H S P Cにおいて、C B Eについ

て以前の段落で記載された同じセットの実験を実施した。より具体的には、A B E m a x - G F P 又は A B E 8 e を発現しているプラスミドを、単一の g R N A を発現しているプラスミド（関連性のない A A V S 1 遺伝子座に標的化する K L F 1 _ b s _ 1 g R N A 又は A A V S 1 g R N A ; Weber et al., Sc. Advances, 2020）と組み合わせて個々にトランスフェクトした。編集された細胞を強化するために、本発明者らは、A B E m a x - G F P 融合タンパク質を発現しているプラスミドを使用したか、又は、本発明者らは、A B E 8 e 発現プラスミド及び G F P m a x 発現プラスミドをコトランスフェクトした。トランスフェクション後、G F P 中間及び G F P 高い細胞を、F A C S で選別して、多種多様な編集効率を有する細胞集団を得た。選別された細胞は、3 相プロトコールを使用して、成熟 R B C へと完全に分化させた。

10

【0158】

塩基編集効率は、赤血球系分化の第一相の終了時（6 日目）に赤芽球において測定された。A B E m a x （K L F 1 結合部位を生じる、K L F 1）及び A B E 8 e （L R F 結合部位の 2 つのチミジンを変換；L R F 2 T）で処理された試料は、G F P 中間及び G F P 高いバルク集団においてそれぞれ、41.0% から 52.3%、及び 56.5% から 76.0% の範囲の効率を示した（図 9 A ~ 9 D）。塩基編集試料の T I D E 分析は、A B E m a x で処理された細胞にインデルが存在しないことを確認したが（図 9 E）、一方、7.9% 及び 14.8% の中程度のインデルの出現頻度が、G F P 中間及び G F P 高い A B E 8 e で処理された試料においてそれぞれ検出された（図 9 E）。

20

【0159】

編集された赤芽球から成熟 R B C へのバルク集団の分化を行なうことにより、H b F の発現及び鎌状化細胞の表現型の回復を評価した。赤血球系分化は、分化に沿って、後期（C D 3 6、C D 7 1 及び α 4 - インテグリン）及び初期（G Y P A 及び B A N D 3）赤血球系マーカーのフローサイトメトリーによる分析によって測定したところ、対照試料と A B E で処理された試料の間で類似していた（データは示されていない）。除核速度は、分化中の様々な時点における群間で類似し、最後の相の終了時には全ての試料において 90% 以上に到達した（データは示されていない）。K L F 1 結合部位又は L R F 2 T プロファイルのいずれかを有する、A B E で処理された試料は、C E - H P L C によって測定したところ、高い H b F レベルを発現した（それぞれ 66.3% 及び 62.6%）（図 9 H）。これらの結果は、R T - q P C R 及び R P - H P L C によって m R N A 及び単一グロビン鎖レベルにおいて確認された（図 9 F 及び 9 G）。フローサイトメトリー分析により、高い出現頻度の H b F を発現している R B C （対照試料、A B E m a x で処理された試料、及び A B E 8 e で処理された試料のそれぞれにおいて、60.4%、94.2% 以上、及び 81.4% 以上）が判明した（図 9 J）。鎌状化アッセイが、対照試料及び編集された試料において実施された。高い出現頻度の修正された細胞が、A B E m a x で処理された試料及び A B E 8 e で処理された試料について観察された（対照試料、A B E m a x で処理された試料、及び A B E 8 e で処理された試料のそれぞれにおいて、14.7%、75.7%、及び 60.6% の非鎌状化細胞）（図 9 I）。全体的には、この試験は、A B E を使用した、H B G 1 / 2 プロモーターの - 200 領域内の L R F 抑制因子結合部位の破壊又は K L F 1 活性化因子結合部位の作出のいずれかにより、胎児ヘモグロビンの再活性化が起こり、S C D 患者の H S P C から分化した R B C における鎌状化表現型が救出されることを示す。

30

40

【0160】

K 5 6 2 細胞及び S C D H S P C における、H B G 1 / 2 プロモーターの効率的な R N A により媒介される編集

初代 H S P C に塩基編集システムを送達するための臨床的に妥当な方法を確認し、最小限の毒性を伴って高い編集効率を達成するために、本発明者らは、塩基エディターをコードしている m R N A 及び修飾された合成 g R N A のトランスフェクションに基づいたプロトコールを最適化した。まず、本発明者らは、インビトロでの転写及び m R N A の生成のために、C B E - S p R Y 及び A B E - S p R Y をコードしているプラスミドを最適化し

50

た。特に、本発明者らは、HBB遺伝子の2コピーの3'非翻訳領域(UTR)(これはmRNAの半減期を延長し、タンパク質レベルを改善することが示されている^{31~33})及びポリA配列を3'UTRの後に挿入することにより、CBE-SpRY及びABE-SpRYの構築物におけるmRNA³⁴を更に安定化させた。

【0161】

次に、本発明者らは、CBE-SpRY-OPT、ABE-SpRY-OPT及びABE8eのプラスミドを使用して、インビトロでmRNAの転写を実施した。K562細胞では、LRF__bs__2、KLF1__bs__1又はBCL11A__bs__1の修飾された合成gRNAと一緒に、CBE-SpRY、ABE-SpRY及びABE8eのmRNAをトランスフェクションすることにより、高い塩基編集効率を得られ、このことは本発明者らが、完全に機能するmRNAを作製したことを実証する。特に、LRF__bs__2又はBCL11A__bs__1gRNAと組み合わせたCBE-SpRY mRNAのトランスフェクションにより、それぞれ87.0%及び83.0%のC>T変換がもたらされた(図10A及び10B)。同様に、ABE-SpRY mRNA及びKLF1__bs__1又はBCL11A__bs__1gRNAのトランスフェクションにより、それぞれ55.0%及び39.0%のA>G変換がもたらされた。最後に、ABE8e mRNA及びBCL11A__bs__1gRNAの共トランスフェクションにより、88.0%の塩基編集効率を得られた(図10C~10E)。

【0162】

CBE-SpRY及びABE8e mRNAも、化学的に修飾された単一gRNAと組み合わせて、SCD HSPCにトランスフェクトした。LRF__bs__1又はLRF__bs__2gRNAと併せたCBE-SpRY mRNAにより、それぞれ51.0%及び61.0%のC>T変換がもたらされ、一方、KLF1__bs__1gRNAと併せたABE8e mRNAにより、75.0%のA>G変換がもたらされた(図10F~10H)。これらの結果は、RNAにより媒介される塩基エディターの送達、SCD HSPCにおけるHBG1/2プロモーターの効率的な標的化を可能とすることを実証する。

【0163】

参考文献：

本出願全体にわたり、様々な参考文献が、本発明が属する技術分野の最新技術を記載している。これらの参考文献の開示は、参照により本開示中に、本明細書により援用される。

【0164】

【表7】

- 1 Taher, Weatherall, and Cappellini, 'Thalassaemia'.
- 2 Kato et al., 'Sickle Cell Disease'.
- 3 Chandrakasan and Malik, 'Gene Therapy for Hemoglobinopathies'.
- 4 Cavazzana, Antoniani, and Miccio, 'Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies'.
- 5 Forget, 'Molecular Basis of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin'.
- 6 Wienert et al., 'Editing the Genome to Introduce a Beneficial Naturally Occurring Mutation Associated with Increased Fetal Globin'.
- 7 Wienert et al., 'KLF1 Drives the Expression of Fetal Hemoglobin in British HPFH'.

10

20

30

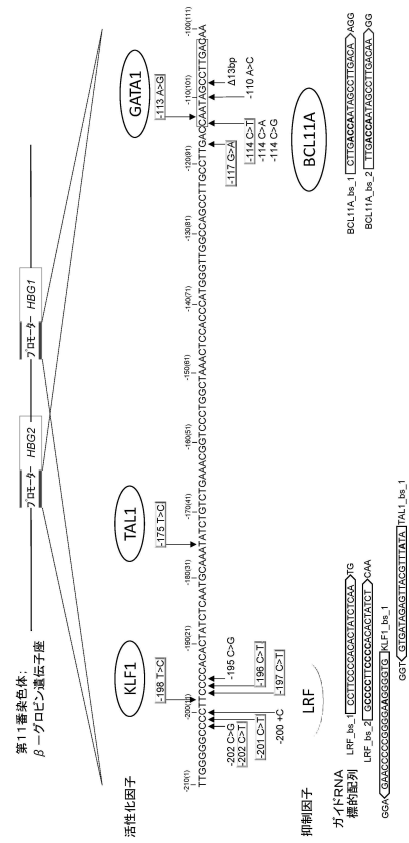
40

50

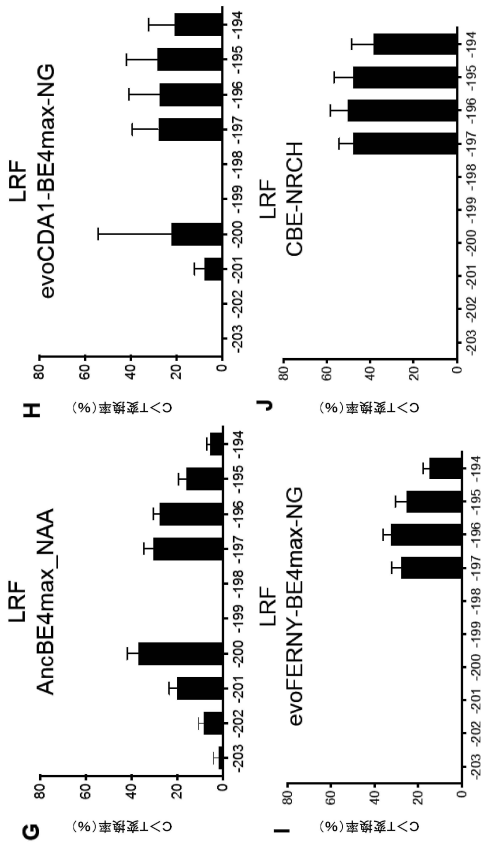
- 8 Martyn et al., 'A Natural Regulatory Mutation in the Proximal Promoter Elevates Fetal Globin Expression by Creating a de Novo GATA1 Site', 1.
- 9 Martyn, Quinlan, and Crossley, 'The Regulation of Human Globin Promoters by CCAAT Box Elements and the Recruitment of NF-Y'.
- 10 Antoniani et al., 'Induction of Fetal Hemoglobin Synthesis by CRISPR/Cas9-Mediated Editing of the Human β -Globin Locus'.
- 11 Weber, Frati et al., 'Editing a γ -Globin Repressor Binding Site Restores Fetal Hemoglobin Synthesis and Corrects the Sickle Cell Disease Phenotype'. 10
- 12 Truong et al., 'Microhomology-Mediated End Joining and Homologous Recombination Share the Initial End Resection Step to Repair DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells'.
- 13 Milyavsky et al., 'A Distinctive DNA Damage Response in Human Hematopoietic Stem Cells Reveals an Apoptosis-Independent Role for P53 in Self-Renewal'.
- 14 Cromer et al., 'Global Transcriptional Response to CRISPR/Cas9-AAV6-Based Genome Editing in CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells'.
- 15 Haapaniemi et al., 'CRISPR-Cas9 Genome Editing Induces a P53-Mediated DNA Damage Response'. 20
- 16 Kosicki, Tomberg, and Bradley, 'Repair of Double-Strand Breaks Induced by CRISPR-Cas9 Leads to Large Deletions and Complex Rearrangements'.
- 17 Gaudelli et al., 'Programmable Base Editing of A•T to G•C in Genomic DNA without DNA Cleavage'.
- 18 Rees and Liu, 'Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells'.
- 19 Yeh et al., 'In Vivo Base Editing of Post-Mitotic Sensory Cells'.
- 20 Masuda et al., 'Transcription Factors LRF and BCL11A Independently Repress Expression of Fetal Hemoglobin'. 30
- 21 Koblan et al., 'Improving Cytidine and Adenine Base Editors by Expression Optimization and Ancestral Reconstruction'.
- 22 Li et al., 'Reactivation of γ -Globin in Adult β -YAC Mice after Ex Vivo and in Vivo Hematopoietic Stem Cell Genome Editing'.
- 23 Behera et al., 'Exploiting Genetic Variation to Uncover Rules of Transcription Factor Binding and Chromatin Accessibility'.
- 24 Brinkman et al., 'Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition'. 40

- 25 Kurita et al., 'Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells'.
- 26 Nettling et al., 'DiffLogo: a comparative visualization of sequence motifs'.
- 27 Kluesner et al., 'EditR: A Method to Quantify Base Editing from Sanger Sequencing'.
- 28 Brinkman et al., 'Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition'.
- 29 Rees et al., 'Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors'.
- 30 Grünewald et al., 'Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors'.
- 31 Karikó, K., Kuo, A. & Barnathan, E. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther.* 6, 1092–1100 (1999).
- 32 Ross, J. & Sullivan, T. D. Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood* 66, 1149–1154 (1985).
- 33 Holtkamp, S. et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108, 4009–4017 (2006).
- 34 Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5, 2108–2116 (1991).

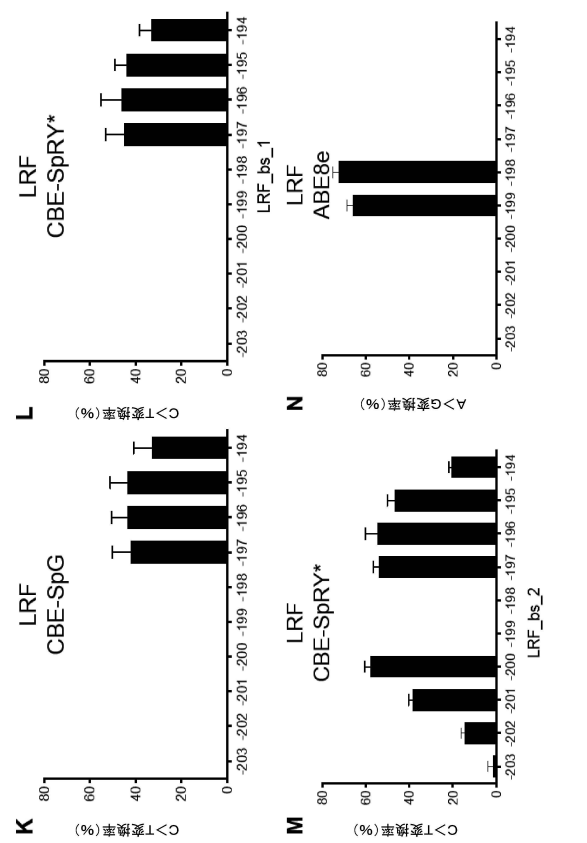
【図面】
【図 1】



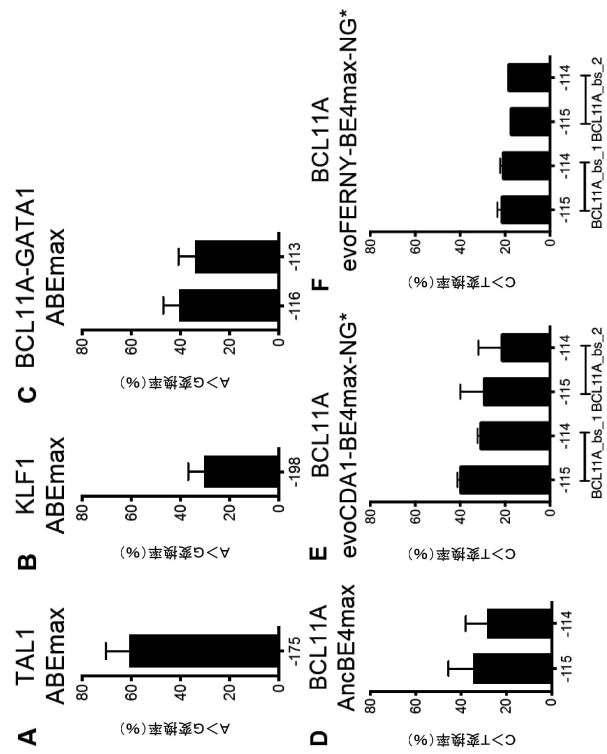
【圖 2-2】



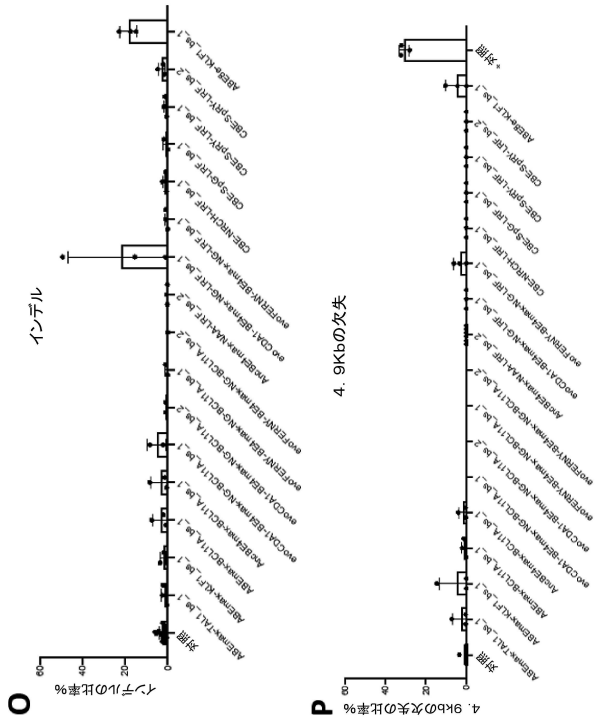
【圖 2-3】



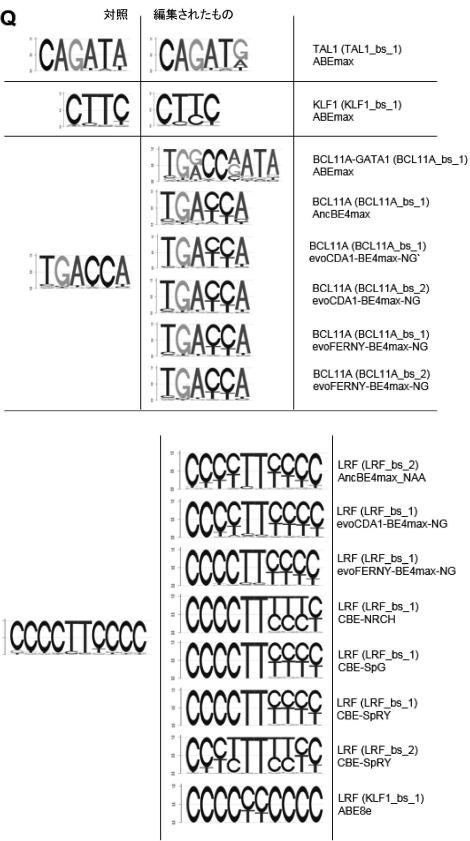
【圖 2 - 1】



【図 2 - 4】



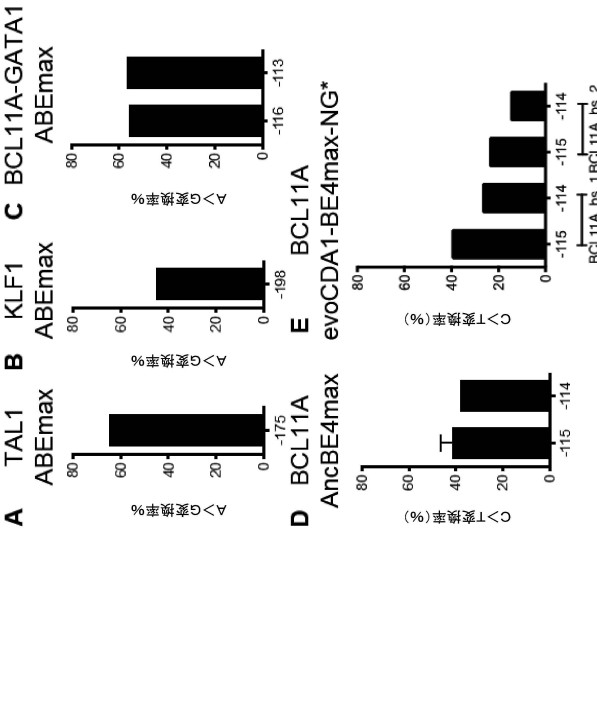
【図 2 - 5】



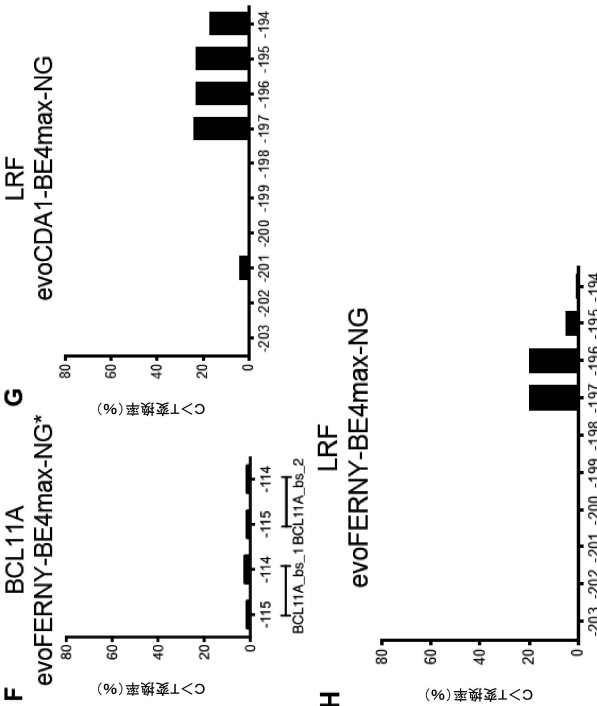
10

20

【図 3 - 1】



【図 3 - 2】

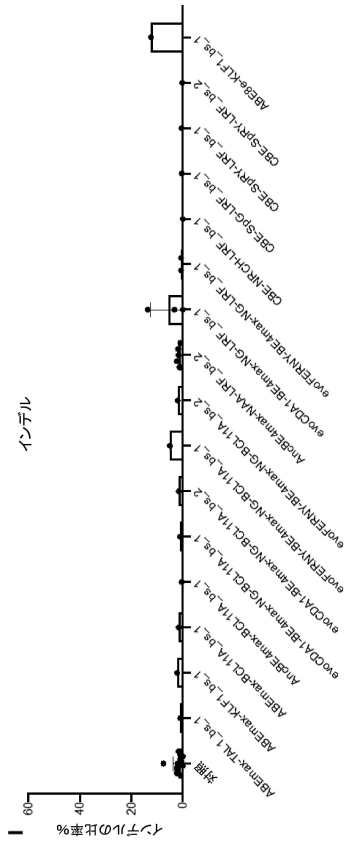


30

40

50

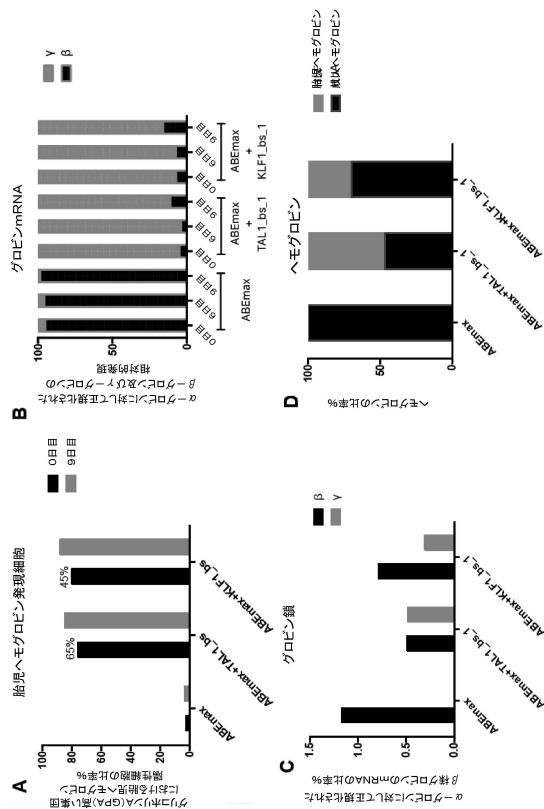
【圖 3 - 3】



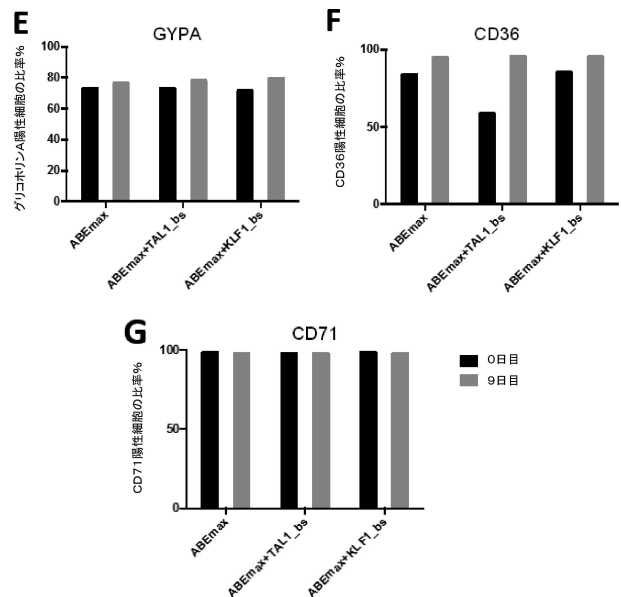
【圖 3 - 4】

対照	編集されたもの	
<u>CAGATA</u>	<u>CAGAT~~G~~</u>	TAL1 (TAL1_bs_1) ABEmax
<u>CTTC</u>	<u>CT~~T~~C</u>	KLF1 (KLF1_bs_1) ABEmax
<u>TGACCA</u>	<u>TG<u>CC</u>CATA</u>	BCL11A-GATA1 (BCL11A_bs_1) ABEmax
	<u>TGA<u>TC</u>A</u>	BCL11A (BCL11A_bs_1) AncBE4max
	<u>TGA<u>TC</u>A</u>	BCL11A (BCL11A_bs_1) evoCDA1-BE4max-NG
	<u>TGA<u>TC</u>A</u>	BCL11A (BCL11A_bs_2) evoCDA1-BE4max-NG
	<u>TGACCA</u>	BCL11A (BCL11A_bs_1) evoFERNY-BE4max-NG
	<u>TGACCA</u>	BCL11A (BCL11A_bs_2) evoFERNY-BE4max-NG
<u>CCCCTTCCCC</u>	<u>CCCCTT<u>CCC</u>C</u>	LRF (LRF_bs_1) evoCDA1-BE4max-NG
<u>CCCCTTCCCC</u>	<u>CCCCTT<u>CCC</u>C</u>	LRF (LRF_bs_1) evoFERNY-BE4max-NG

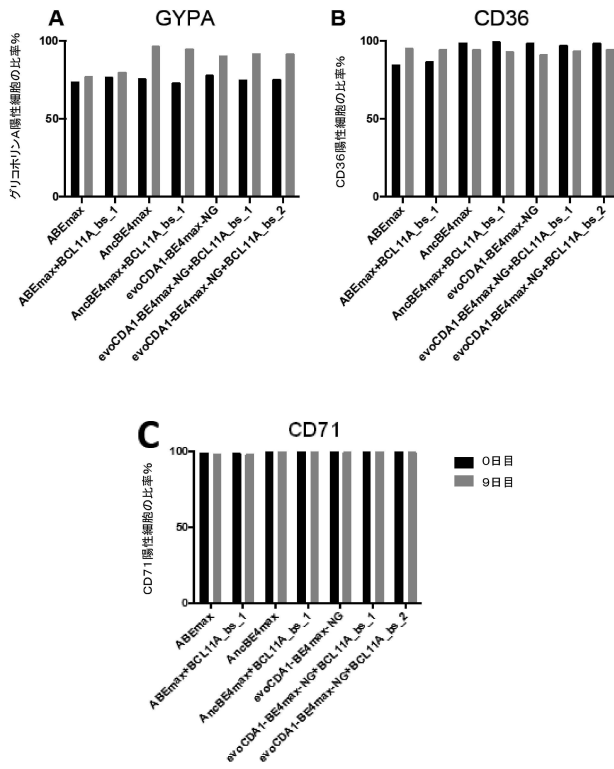
【圖 4 - 1】



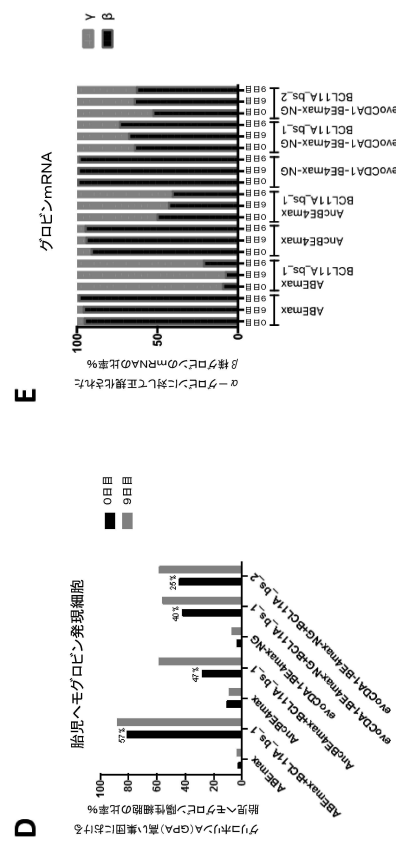
【圖 4-2】



【図 5 - 1】



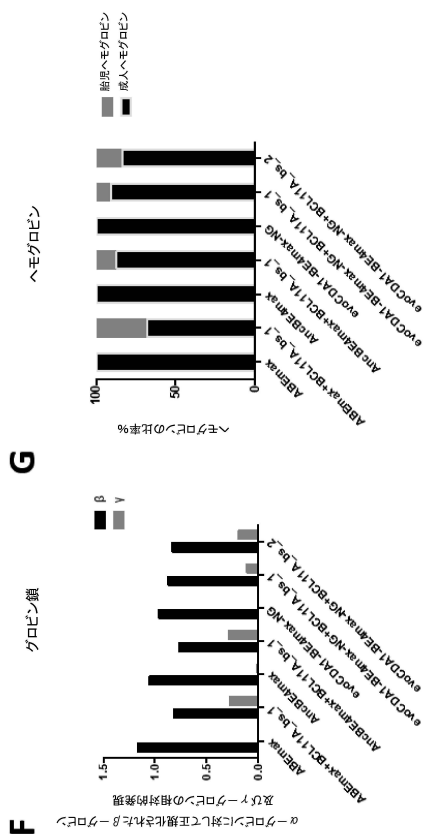
【図 5 - 2】



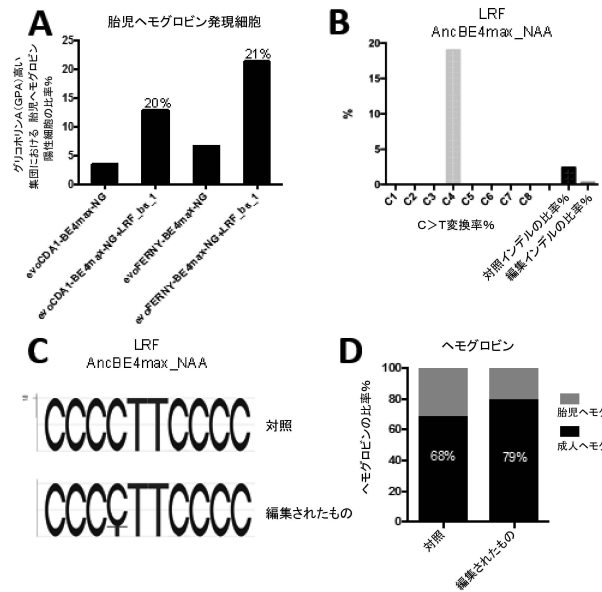
10

20

【図 5 - 3】



【図 6】

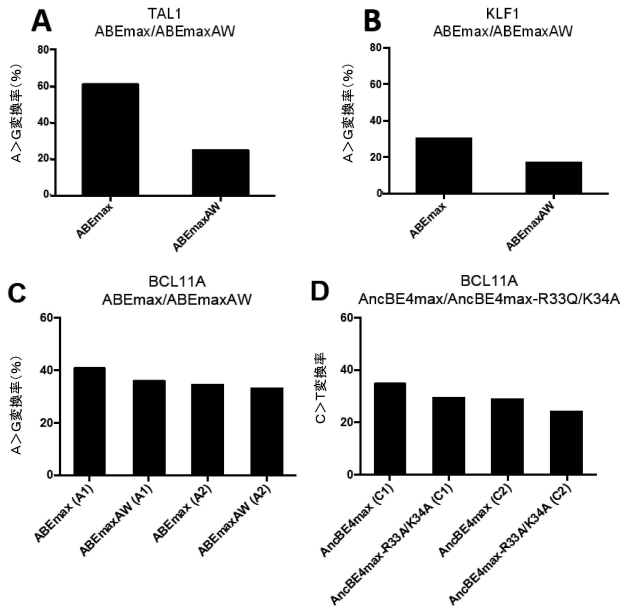


30

40

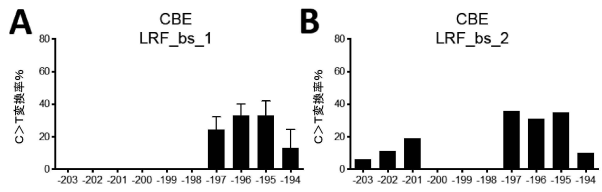
50

【図 7】

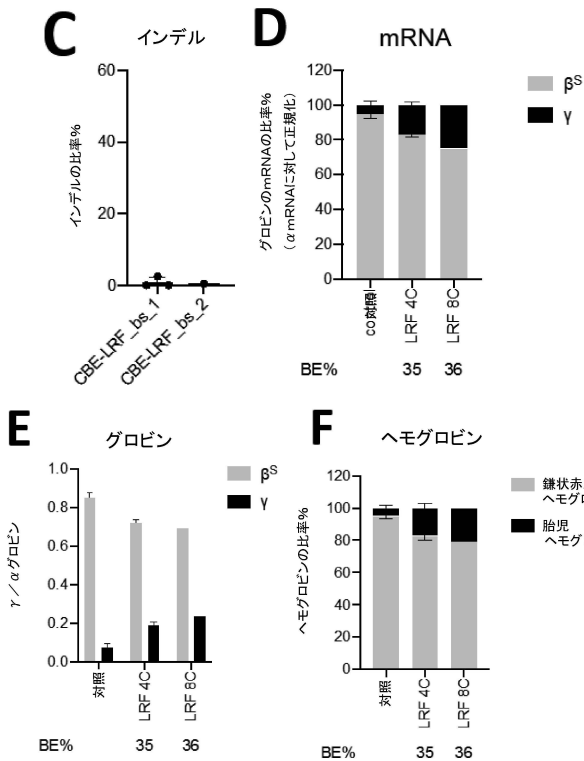


10

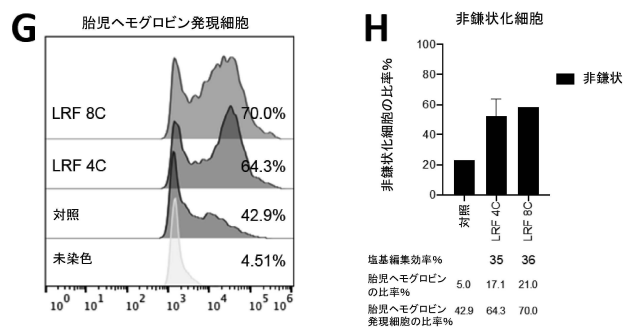
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 8 - 3】

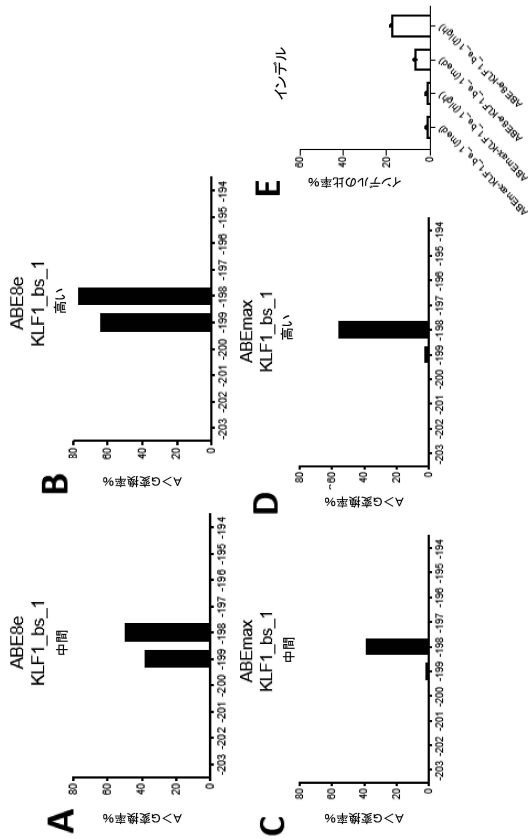


30

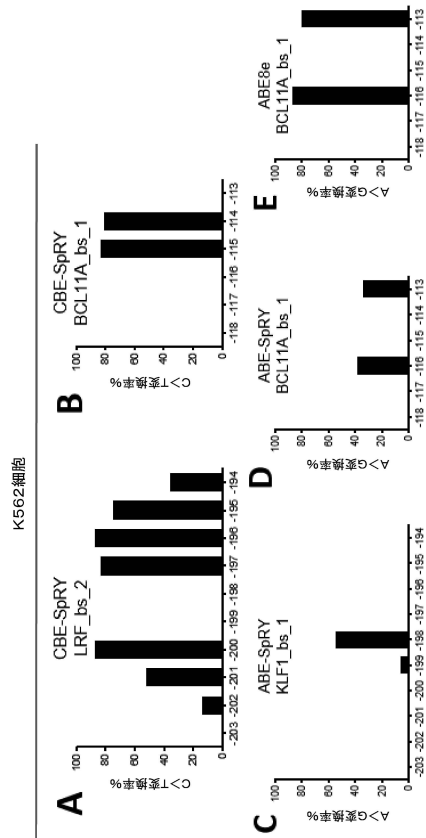
40

50

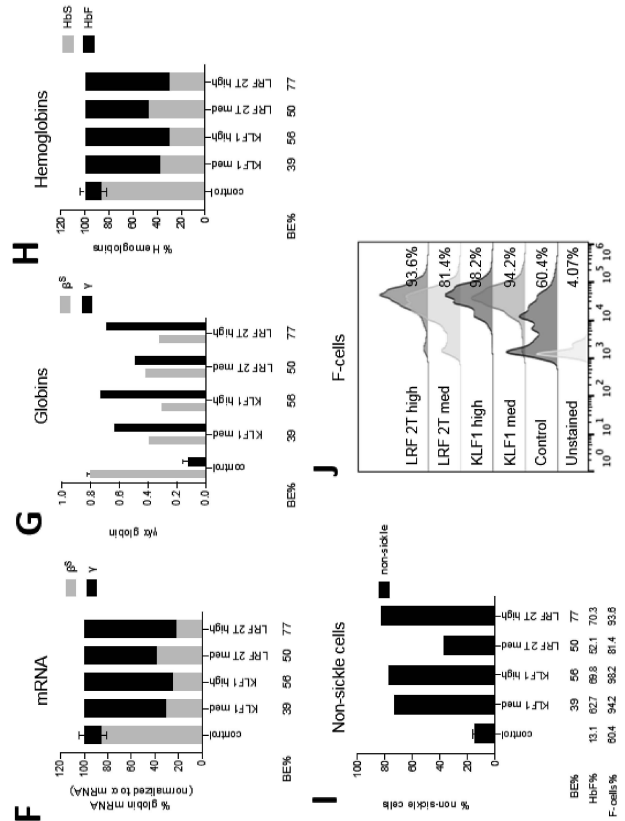
【図 9 - 1】



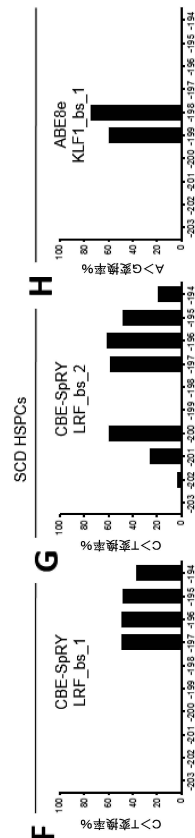
【図 10 - 1】



【図 9 - 2】



【図 10 - 2】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023526007000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/113 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 C40B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Leslie Weber et al.: "Editing a gamma-globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype", Science Advances, 12 February 2020 (2020-02-12), XP055737070, Retrieved from the Internet: URL:https://advances.sciencemag.org/content/advances/6/7/eaay9392.full.pdf [retrieved on 2020-10-06]	1,5-9, 16-19
Y	the whole document -/--	3,10-14
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 August 2021		Date of mailing of the international search report 25/08/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Macchia, Giovanni

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2021/062633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& LESLIE WEBER ET AL.: "supplementary online data", SCIENCE ADVANCES, vol. 6, no. 7, 1 February 2020 (2020-02-01), page eaay9392, XP055737069, DOI: 10.1126/sciadv.aay9392 the whole document ----- X Jean-Yves Métais et al.: "Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin", Blood Advances, vol. 3, no. 21 6 November 2019 (2019-11-06), XP055736662, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6855127/pdf/advancesADV2019000820.pdf [retrieved on 2020-10-05] the whole document -& J.-Y. Métais et al.: "supplementary data", 6 November 2019 (2019-11-06), XP055736671, Retrieved from the Internet: URL:https://ashpublications.org/bloodadvances/article/3/21/3379/422725/Genome-editing-of-HBG1-and-HBG2-to-induce-fetal [retrieved on 2020-10-05] the whole document ----- X ELIZABETH A TRAXLER ET AL.: "A genome-editing strategy to treat beta-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition", NATURE MEDICINE, vol. 22, no. 9, 15 August 2016 (2016-08-15), pages 987-990, XP055372350, New York ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.4170 the whole document -& Traxler: "supplementary data", 1 September 2016 (2016-09-01), XP055736707, Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706766/ [retrieved on 2020-10-05] the whole document ----- -/--	1,7,9, 18,19 1,7,9, 18,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHER T. LUX ET AL.: "TALEN-mediated gene editing of HBG in human hematopoietic stem cells leads to therapeutic fetal hemoglobin induction", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 12, 1 March 2019 (2019-03-01), pages 175-183, XP055737052, GB ISSN: 2329-0501, DOI: 10.1016/j.omtm.2018.12.008 the whole document	1,7,9, 18,19
X	GABRIELLA E. MARTYN ET AL.: "A natural regulatory mutation in the proximal promoter elevates fetal globin expression by creating a de novo GATA1 site", BLOOD, vol. 133, no. 8, 21 February 2019 (2019-02-21), pages 852-856, XP055737212, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2018-07-863951 the whole document -& Martyn et al.: "supplemental online data", 21 February 2019 (2019-02-21), XP055737247, Retrieved from the Internet: URL:https://ash.silverchair-cdn.com/ash/content_public/journal/blood/133/8/10.1182_blood-2018-07-863951/3/blood8863951-suppl1.pdf?Expires=1605018363&Signature=Qe0W7jYj0c3t9XATjN6dy0mDFZwudSgk4eqz~ogxTr7-s2XRKJiZ~-R6Gi50iC0i1VHrnnvqiQwg50EQQhkfkGh6`nMutmHiweTa1NmJ6cDemRDGU0AzvpNJU2-Gmk5e0antj2us7SbXejgl-[retrieved on 2020-10-06] the whole document	1,4,18, 19
X	WO 2020/053224 A1 (INSERM [FR] UNIV PARIS DESCARTES [FR] APHP [FR] FONDATION IMAGINE [FR]) 19 March 2020 (2020-03-19)	1,15
Y	page 1, line 29 - page 2, line 2 the whole document page 18	3,10-14
X	WO 2019/217942 A1 (BEAM THERAPEUTICS INC. [US]) 14 November 2019 (2019-11-14) Sequence 7 is 100% identical to SEQ ID NO:48 in Table B of present application; page 198; claim 195; sequence 7 -/--	1,2,15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 3 of 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062633

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& DATABASE Geneseq [Online] 9 January 2020 (2020-01-09), Beam Therapeutics: "SEQ ID NO:205 of WO 2019/217942", XP055740565, Database accession no. BGZ11067 SEQ ID NO:205 is 100% identical to SEQ ID NO:49 in Table B of present application -& DATABASE Geneseq [Online] 9 January 2020 (2020-01-09), Beam Therapeutics: "SEQ ID NO:176 of WO 2019/217942", XP055740571, Database accession no. BGZ11038 SEQ ID NO:176 is 100% identical to SEQ ID NO:50 in Table B of present application ----- X WO 2019/178426 A1 (EDITAS MEDICINE, INC. [US]) 19 September 2019 (2019-09-19) SEQ ID NO:1256, 1257 are 100% complementary to SEQ ID NO:51; page 155; example 24; sequences 1256, 1257 SEQ ID NO:495 corresponds to the region targeted by SEQ ID NO:53 of present application -& DATABASE Geneseq [Online] 31 October 2019 (2019-10-31), Editas Medicine: "SEQ ID NO:495 of WO 2019/178426", XP055740681, Database accession no. BGT17886 ----- Y ALEXIS C. KOMOR ET AL.: "Editing the genome without double-stranded DNA breaks", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 13, no. 2, 9 October 2017 (2017-10-09), pages 383-388, XP055605572, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/acscchembio.7b00710 the whole document ----- Y WO 2013/126794 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTRE [US]) 29 August 2013 (2013-08-29) page 29, paragraph [123] ----- -/--	10 20 1,2,15 30 10-14 3 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BEEKE WIENERT ET AL.: "KLF1 drives fetal Hemoglobin in British HPFH", BLOOD, vol. 130, no. 6, 10 August 2017 (2017-08-10), pages 803-807, XP055739661, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2017-02-767400 the whole document -& Wienert et al.: "Supplemental online data", 10 August 2017 (2017-08-10), XP055739663, Retrieved from the Internet: URL:https://ash.silverchair-cdn.com/ash/content_public/journal/blood/130/6/10.1182/blood-2017-02-767400/4/blood-2017-02-767400-1.pdf?Expires=1605144541&Signature=MwqXoT18rnPpTnA4TxLef9dQynb5J2xi~qGADkohS32wAb0z2PZbSq18yRrAU1XAXtuQy6n0KZWYBj5MhXVFUN1hfwRH7LNKKtaTdzwqGceaEdS~oP-MDhsk852F4EeqH99hRw0ko5b20D [retrieved on 2020-10-13] the whole document	3
A	MARTYN GABRIELLA E. ET AL.: "The regulation of human globin promoters by CCAAT box elements and the recruitment of NF-Y", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE REGULATORY MECHANISMS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1860, no. 5, 5 October 2016 (2016-10-05), pages 525-536, XP085022481, ISSN: 1874-9399, DOI: 10.1016/J.BBAGRM.2016.10.002 the whole document	2-4,6,8
A	WIENERT BEEKE ET AL.: "Wake-up sleepy gene: reactivating Fetal Globin for [beta]-hemoglobinopathies", TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 34, no. 12, 1 October 2018 (2018-10-01), pages 927-940, XP085538572, ISSN: 0168-9525, DOI: 10.1016/J.TIG.2018.09.004 page 933	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/062633

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIJAY G. SANKARAN ET AL.: "Advances in the understanding of haemoglobin switching", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 149, no. 2, 1 April 2010 (2010-04-01) , pages 181-194, XP055739666, GB ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08105.x the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2021/062633

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/062633

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020053224 A1	19-03-2020	EP 3850094 A1 WO 2020053224 A1	21-07-2021 19-03-2020
WO 2019217942 A1	14-11-2019	AU 2019265019 A1 CA 3100019 A1 CN 112534054 A EP 3799603 A1 KR 20210023831 A WO 2019217942 A1	26-11-2020 14-11-2019 19-03-2021 07-04-2021 04-03-2021 14-11-2019
WO 2019178426 A1	19-09-2019	AU 2019236209 A1 BR 112020018364 A2 CA 3093702 A1 CN 112020558 A EP 3765614 A1 JP 2021518102 A KR 20200132924 A SG 11202008956X A WO 2019178426 A1	01-10-2020 29-12-2020 19-09-2019 01-12-2020 20-01-2021 02-08-2021 25-11-2020 29-10-2020 19-09-2019
WO 2013126794 A1	29-08-2013	AU 2013222170 A1 AU 2017201235 A1 BR 112014020625 A2 CA 2865129 A1 CN 104284669 A DK 2836226 T3 EP 2836226 A1 EP 3272356 A1 ES 2641840 T3 HK 1249861 A1 IL 234225 A JP 6170080 B2 JP 2015516146 A JP 2017148056 A KR 20140128453 A KR 20180009383 A NZ 630900 A RU 2014138491 A RU 2018109507 A SG 10201606959P A SG 11201405103S A US 2015166969 A1 US 2017298329 A1 WO 2013126794 A1 ZA 201406187 B	02-10-2014 16-03-2017 04-07-2017 29-08-2013 14-01-2015 18-09-2017 18-02-2015 24-01-2018 14-11-2017 16-11-2018 30-05-2019 26-07-2017 11-06-2015 31-08-2017 05-11-2014 26-01-2018 28-10-2016 10-04-2016 28-02-2019 29-09-2016 26-09-2014 18-06-2015 19-10-2017 29-08-2013 30-05-2018

フロントページの続き

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,N
E,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,K
E,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,N
G,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

— HOPITAUX DE PARIS

フランス国パリ、ブルヴァール、ディデュロ、55

(71)出願人 515028470

フォндаシオン・イマジネ

FONDATION IMAGINE

フランス国、エフー75015 パリ、ブルヴァール・ドゥ・モンパルナス 24

(74)代理人 110001508

弁理士法人 津国

(72)発明者 ミッチョ、アンナリタ

フランス国、75015 パリ、ブルヴァール・デュ・モンパルナス 24、ユニヴェルシテ・パ
リ・デカルト、ユエムエール1163、アンスティテュ・イマジネ

(72)発明者 アントニウ、パナヨティス

フランス国、75015 パリ、ブルヴァール・デュ・モンパルナス 24、アンスティテュ・イ
マジネ、ユエムエール1163

(72)発明者 カヴァッツァーナ、マリナ

フランス国、75015 パリ、ブルヴァール・デュ・モンパルナス 24、アンセルム・ユ11
63、アンスティテュ・イマジネ

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB65 NA05 NA14 ZA51