

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-551874

(P2023-551874A)

(43)公表日 令和5年12月13日(2023.12.13)

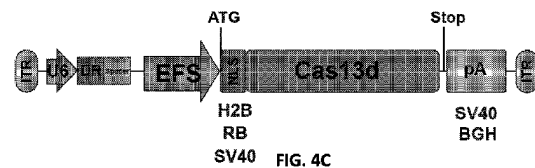
(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/55 (2006.01)	C 1 2 N 15/55	4 C 0 8 7
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/435 (2006.01)	C 0 7 K 14/435	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全186頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-533279(P2023-533279)	(71)出願人	520481046
(86)(22)出願日	令和3年12月1日(2021.12.1)		ロックアネイビオ, インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年7月21日(2023.7.21)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1
(86)国際出願番号	PCT/US2021/061490		2 1, サンディエゴ, ジョン ホプキ
(87)国際公開番号	WO2022/119979		ンズ コート 3 5 4 5, 스위트 2 0 0
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)		
(31)優先権主張番号	63/119,977	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和2年12月1日(2020.12.1)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	63/130,092		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和2年12月23日(2020.12.23)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号	63/278,746	(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
	最終頁に続く	(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 筋強直性ジストロフィー1型を処置するためのRNA標的化組成物および方法

(57)【要約】

毒性標的CUGリピートRNAを破壊または遮断するための、ならびにDM1を処置するための、RNA標的化遺伝子治療用組成物およびRNA標的化遺伝子治療方法が、開示される。本開示は、筋強直性ジストロフィー1型(DM1)を処置するための組成物および方法を提供する。本明細書に開示される組成物および方法は、分解または遮断のどちらかによるCUG^{exp}(CUGリピート伸長)RNAの用量依存的低減、DMPKの低減、ならびに選択的スプライシングおよび筋強直のその後の修正をもたらす。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

毒性標的 C U G リピート R N A 配列に結合することができるガイドされない R N A 結合性ポリペプチドまたはガイドされる R N A 結合性ポリペプチドを含む R N A 結合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む組成物。

【請求項 2】

前記 R N A 結合性ポリペプチドが、融合タンパク質である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記融合タンパク質が、前記毒性 C U G リピート R N A 配列を切断することができるエンドヌクレアーゼと融合した前記 R N A 結合性ポリペプチドを含む、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記ガイドされない R N A 結合性ポリペプチドが、P U F または P U M B Y タンパク質である、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記ガイドされる R N A 結合性ポリペプチドが、C a s 1 3 d タンパク質である、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記 c a s 1 3 d タンパク質が、触媒的に失活している、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 7】

前記 c a s 1 3 d タンパク質が、配列番号 5 8 3 または 5 8 6 ~ 5 8 9 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記エンドヌクレアーゼが、Z C 3 H 1 2 A ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインである、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

P U F R N A 結合性タンパク質が、配列番号 4 4 4 ~ 4 5 1、4 6 1、5 7 0、または 6 3 8 ~ 6 4 9 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 10】

前記 P U F R N A 結合性タンパク質が、配列番号 4 4 4 で示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記毒性標的 C U G R N A リピート配列が、配列番号 4 5 3 ~ 4 5 6 で示される核酸配列のいずれか 1 つを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記毒性標的 C U G R N A リピート配列が、配列番号 4 5 4 で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

C U G 標的化 P U F タンパク質が、配列番号 4 5 2 で示される核酸配列によってコードされる、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 14】

前記 P U F または P U M B Y タンパク質が、ヒト P U F または P U M B Y タンパク質である、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記 P U F または P U M B Y タンパク質が、リンカー配列によって前記 Z C 3 H 1 2 A エンドヌクレアーゼに連結されている、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

前記リンカーが、配列番号 4 1 1 で示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれ

50

か一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記融合タンパク質が、核局在化配列（NLS）、および核外輸送配列（NES）からなる群から選択される1つまたは複数のシグナル配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記 Z C 3 H 1 2 A ジンクフィンガーヌクレアーゼが、配列番号 358 または配列番号 359 で示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記融合タンパク質が、配列番号 559～567 のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 20】

前記融合タンパク質が、配列番号 460、配列番号 516 または配列番号 517 を含む核酸配列によってコードされる、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記融合タンパク質をコードする核酸分子が、プロモーターを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記プロモーターが、t C A G プロモーター、E F S / U B B プロモーター、デスミンプロモーター、C K 8 e プロモーター、または E F S プロモーターである、前記請求項のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 23】

前記請求項のいずれか一項に記載の組成物を含む、ベクター。

【請求項 24】

アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、およびデンドリマーからなる群から選択される、請求項 23 に記載のベクター。

【請求項 25】

AAV ベクターである、請求項 23 に記載のベクター。

【請求項 26】

第1の A A V I T R 配列と、
第1のプロモーター配列と、
少なくとも1つの C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、
第2の A A V I T R 配列と
を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

30

【請求項 27】

前記 C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドが、P U F または P U M B Y タンパク質を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 28】

P U F または P U M B Y 配列をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 452 で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

40

【請求項 29】

前記 C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドが、C a s 13 d タンパク質を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 30】

C a s 13 d 配列をコードする前記ポリヌクレオチド配列が、配列番号 601、612 または 615～618 で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の A A V ベクター。

【請求項 31】

50

前記第1のプロモーター配列が、配列番号568、569、608、609、634～637で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項32】

前記第1のAAV ITR配列が、配列番号599または600で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項33】

前記第2のAAV ITR配列が、配列番号599または600で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項34】

第2のプロモーター配列をさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項35】

前記第2のプロモーターが、ガイドRNA (gRNA) の発現を制御し、前記gRNAが、(i) DR配列および(ii) スパーサー配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項36】

前記第2のプロモーターが、配列番号519で示される核酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項37】

ポリA配列をさらに含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項38】

少なくとも1つのリンカー配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項39】

少なくとも1つの核局在化配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項40】

前記ベクターが、配列番号574～582、584～585、590～597のいずれかで示される核酸でコードされる、前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクター。

【請求項41】

a) 請求項26から40のいずれか一項に記載のAAVウイルスベクターと、
b) 少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤および／または添加剤とを含む、医薬組成物。

【請求項42】

a) 前記請求項のいずれか一項に記載のAAVベクターと、
b) AAVカプシドタンパク質とを含む、AAVウイルスベクター。

【請求項43】

前記AAVカプシドタンパク質が、AAV1カプシドタンパク質、AAV2カプシドタンパク質、AAV4カプシドタンパク質、AAV5カプシドタンパク質、AAV6カプシドタンパク質、AAV7カプシドタンパク質、AAV8カプシドタンパク質、AAV9カプシドタンパク質、AAV10カプシドタンパク質、AAV11カプシドタンパク質、AAV12カプシドタンパク質、AAV13カプシドタンパク質、AAVPHP.Bカプシドタンパク質、AAVrh74カプシドタンパク質またはAAVrh.10カプシドタンパク質である、請求項42に記載のAAVウイルスベクター。

【請求項44】

前記AAVカプシドタンパク質が、AAV9カプシドタンパク質である、請求項21に記載のAAVウイルスベクター。

【請求項45】

前記請求項のいずれか一項に記載のベクターを含む、細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 46】

哺乳動物における筋強直性ジストロフィー1型（DM1）を処置する方法であって、請求項1から45のいずれか一項に記載の組成物またはAAVベクターを、前記哺乳動物の組織における毒性標的CUGマイクロサテライトリピート伸長（MRE）RNA配列に投与するステップを含み、それによって毒性標的RNAの発現レベルが低下される、方法。

【請求項 47】

前記組成物またはAAVベクターが、対象に、静脈内、くも膜下腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは目周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸膜内、局部、リンパ内、大槽内投与されるか、または神経内にある、請求項46に記載の方法。

10

【請求項 48】

前記組成物またはAAVベクターが、対象に静脈内投与される、請求項46に記載の方法。

【請求項 49】

前記毒性標的RNAの発現レベルの低下によって、前記哺乳動物におけるDM1の症状が好転する、請求項46に記載の方法。

【請求項 50】

前記毒性標的RNAの前記発現レベルが、未処置毒性標的CUG RNAの発現レベルの低下と比較して低下される、請求項46に記載の方法。

【請求項 51】

20

低下のレベルが、1倍～20倍の間である、請求項46に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

開示の分野

本開示は、分子生物学、遺伝子治療、ならびにRNA分子の発現および活性を改変するための組成物および方法を対象とする。

【0002】

関連出願

本出願は、2020年12月1日出願した米国特許出願第63／119,977号、2020年12月23日出願した米国特許出願第63／130,092号および2021年11月12日出願した米国特許出願第63／278,746号に基づく利益および優先権を主張するものである。各々の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0003】

配列表の参照による組込み

2021年12月1日に作成された1.81MBサイズの「LOCN_007_001WO__SeqList_ST25」という名称のテキストファイルの内容は、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

40

【0004】

背景

有効な遺伝子治療を提供する有効なRNA標的化系を提供することについて長年にわたるが満たされていない必要性が当技術分野において存在する。特に、本開示は、筋強直性ジストロフィー1型（DM1）として公知のマイクロサテライトリピート伸長（MRE）病の際に反復トラクトから発現される毒性RNAを特異的に標的とし、分解するための、組成物および方法を提供する。DM1は、DMPK遺伝子の3'非翻訳領域におけるCTG MREによって引き起こされる多臓器型の常染色体優性遺伝性障害である。全てのMRE病について言えば、利用可能な処置は、DM1の症状に対処するが、その基礎にある病因を標的としない。ゲノム編集でDNAにおけるMREを消失させることにより、DM

50

1を引き起こす病原性MREを消失させることができるだろうが、リピート付近でのDNAの破壊(break)の発生は、その活性が伸長部の成長に関連している修復機構を活性化し、リピートのさらなる変異を引き起こすことがあり、および／または病原性のリピートを、転写を調節する役割を有する正常なリピートと区別することができないことがある。他の可能性のあるDM1治療、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNAおよび小分子が、評価されているが、これらは、頻繁な再投与、罹患組織の浸透不良、リピートとの直接エンゲージメントの欠如、毒性およびオフターゲット効果に関する問題に悩まされる。これらの問題を克服しようとする努力の中で、Cas9に基づくRNA標的化系(RCas9)は、マウスにおいて毒性CUGリピートRNAを特異的に標的とすることができ、成人発症性筋強直性ジストロフィーのDM1に関連する疾患表現型の長期修復をもたらすことができることが示された。しかし、他の非Cas9 RNA結合性の系の詳細を明らかにする必要がある、これらの系を、DM1の処置のための有効な、持続的な、かつスケーラブルな遺伝子治療を提供するために開発する必要がある。CUG MREを標的とするそのような非Cas9 RNA結合性の系は、系の成分がユニタリーベクターに頼れるほど小さいサイズであることから製造規模にとって重要である。これらの非RCas9系は、免疫原性Cas9成分によって誘発される一切の有害な免疫応答を回避するためにも重要である。したがって、毒性CUGリピートを消失させることができる、新たな、改善された、RNA標的化非RCas9遺伝子治療用組成物および系、ならびにDM1を処置するためにそれを使用する方法が、本明細書において提供される。

10

【発明の概要】

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

要旨

本開示は、筋強直性ジストロフィー1型(DM1)を処置するための組成物および方法を提供する。本明細書に開示される組成物および方法は、分解または遮断のどちらかによるCUG^{exP}(CUGリピート伸長)RNAの用量依存的低減、DMPKの低減、ならびに選択的スプライシングおよび筋強直のその後の修正をもたらす。

【0006】

毒性標的CUGリピートRNA配列に結合することができるPUFまたはPUMBYタンパク質を含むガイドされないRNA結合性タンパク質をコードする核酸を含む組成物であって、RNA結合性タンパク質が、毒性標的CUGリピートRNA配列を切断することができない、組成物が、本明細書に開示される。

30

【0007】

ガイドされないRNA結合性融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組成物であって、前記融合タンパク質が、a)毒性標的CUGリピートRNA配列に結合することができるPUFまたはPUMBYタンパク質、およびb)毒性標的RNA配列を切断することができるエンドヌクレアーゼを含み、エンドヌクレアーゼが、ZC3H12Aジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインである、組成物が、本明細書に開示される。

【0008】

40

本開示は、毒性標的CUGリピートRNA配列に結合することができるガイドされないRNA結合性ポリペプチドまたはガイドされるRNA結合性ポリペプチドを含むRNA結合性ポリペプチドをコードする核酸配列を含む組成物を提供する。

【0009】

一部の実施形態では、RNA結合性ポリペプチドは、融合タンパク質である。

【0010】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、毒性CUGリピートRNA配列を切断することができるエンドヌクレアーゼと融合したRNA結合性ポリペプチドを含む。

【0011】

一部の実施形態では、ガイドされないRNA結合性ポリペプチドは、PUFまたはPU

50

M B Y タンパク質である。

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、ガイドされるRNA結合性ポリペプチドは。一部の実施形態では、c a s 1 3 d タンパク質は、触媒的に失活している。一部の実施形態では、c a s 1 3 d タンパク質は、配列番号583または586～589のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Z C 3 H 1 2 A ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインである。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、P U F RNA結合性タンパク質は、配列番号444～451、461、570、または638～649のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、P U F RNA結合性タンパク質は、配列番号444で示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、毒性標的C U G RNAリピート配列は、配列番号453～456で示される核酸配列のいずれか1つを含む。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、毒性標的C U G RNAリピート配列は、配列番号454で示される核酸配列を含む。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、C U G 標的化P U F タンパク質は、配列番号452で示される核酸配列によってコードされる。一部の実施形態では、P U F またはP U M B Y タンパク質は、ヒトP U F またはP U M B Y タンパク質である。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、P U F またはP U M B Y タンパク質は、リンカー配列によってZ C 3 H 1 2 A エンドヌクレアーゼに連結されている。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、リンカーは、配列番号411で示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 0 】

融合タンパク質は、核局在化配列（N L S）、および核外輸送配列（N E S）からなる群から選択される1つまたは複数のシグナル配列を含む。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、Z C 3 H 1 2 A ジンクフィンガーヌクレアーゼは、配列番号358または配列番号359で示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号559～567のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号460、配列番号516または配列番号517を含む核酸配列によってコードされる。

【 0 0 2 3 】

一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸分子は、プロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、t C A G プロモーター、E F S / U B B プロモーター、デスミンプロモーター、C K 8 e プロモーター、またはE F S プロモーターである。

【 0 0 2 4 】

本開示は、本開示のいずれかの実施形態の組成物を含むベクターを提供する。

【 0 0 2 5 】

一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルス（A A V）、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リボソーム、リボプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、およびデンドリマーからなる群から選択される。本開示は、第1のA

10

20

30

40

50

A V I T R 配列と、第 1 のプロモーター配列と、少なくとも 1 つの C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列と、第 2 の A A V I T R 配列とを含む本開示のいずれかの実施形態の A A V ベクターを提供する。

【 0 0 2 6 】

一部の実施形態では、C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドは、P U F または P U M B Y タンパク質を含む。一部の実施形態では、P U F または P U M B Y 配列をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 4 5 2 で示される核酸配列を含む。

【 0 0 2 7 】

一部の実施形態では、C U G リピート R N A 結合性ポリペプチドは、C a s 1 3 d タンパク質を含む。一部の実施形態では、C a s 1 3 d 配列をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号 6 0 1、6 1 2 または 6 1 5 ~ 6 1 8 で示される核酸配列を含む。

10

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態では、第 1 のプロモーター配列は、配列番号 5 6 8、5 6 9、6 0 8、6 0 9、6 3 4 ~ 6 3 7 で示される核酸配列を含む。

【 0 0 2 9 】

一部の実施形態では、第 1 の A A V I T R 配列は、配列番号 5 9 9 または 6 0 0 で示される核酸配列を含む。一部の実施形態では、第 2 の A A V I T R 配列は、配列番号 5 9 9 または 6 0 0 で示される核酸配列を含む。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、第 2 のプロモーター配列をさらに含む。一部の実施形態では、第 2 のプロモーターは、ガイド R N A (g R N A) の発現を制御し、g R N A は、(i) D R R 配列および (i i) スペーサー配列を含む。一部の実施形態では、第 2 のプロモーターは、配列番号 5 1 9 で示される核酸配列を含む。

20

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態では、ポリ A 配列をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのリンカー配列を含む。一部の実施形態では、ベクターは、少なくとも 1 つの核局在化配列を含む。

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、ベクターは、配列番号 5 7 4 ~ 5 8 2、5 8 4 ~ 5 8 5、5 9 0 ~ 5 9 7 のいずれかで示される核酸でコードされる。

30

【 0 0 3 3 】

本開示は、a) 本開示のいずれかの実施形態の A A V ウイルスベクターと、b) 少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤および／または添加剤とを含む、医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 4 】

本開示は、a) 本開示のいずれかの実施形態の A A V ベクターと、b) A A V カプシドタンパク質とを含む、A A V ウイルスベクターを提供する。一部の実施形態では、A A V カプシドタンパク質は、A A V 1 カプシドタンパク質、A A V 2 カプシドタンパク質、A A V 4 カプシドタンパク質、A A V 5 カプシドタンパク質、A A V 6 カプシドタンパク質、A A V 7 カプシドタンパク質、A A V 8 カプシドタンパク質、A A V 9 カプシドタンパク質、A A V 1 0 カプシドタンパク質、A A V 1 1 カプシドタンパク質、A A V 1 2 カプシドタンパク質、A A V 1 3 カプシドタンパク質、A A V P H P、B カプシドタンパク質、A A V r h 7 4 カプシドタンパク質または A A V r h、1 0 カプシドタンパク質である。一部の実施形態では、A A V カプシドタンパク質は、A A V 9 カプシドタンパク質である。

40

【 0 0 3 5 】

本開示の実施形態のいずれか 1 つのベクターを含む、細胞。

【 0 0 3 6 】

本開示は、哺乳動物における筋強直性ジストロフィー 1 型 (D M 1) を処置する方法であって、本開示のいずれかの実施形態の組成物または A A V ベクターを、哺乳動物の組織

50

における毒性標的 C U G マイクロサテライトリピート伸長 (M R E) R N A 配列に投与するステップを含み、それによって毒性標的 R N A の発現レベルが低下される、方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

一部の実施形態では、組成物または A A V ベクターは、対象に、静脈内、くも膜下腔内、脳内、脳室内、鼻腔内、気管内、耳内、眼内もしくは目周囲、経口、直腸、経粘膜、吸入、経皮、非経口、皮下、皮内、筋肉内、大槽内、神経内、胸膜内、局部、リンパ内、大槽内投与されるか、または神経内にある。

【 0 0 3 8 】

一部の実施形態では、組成物または A A V ベクターは、対象に静脈内投与される。

10

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、毒性標的 R N A の発現レベルの低下によって、哺乳動物における D M 1 の症状が好転する。一部の実施形態では、毒性標的 R N A の発現レベルは、未処置毒性標的 C U G R N A の発現レベルの低下と比較して低下される。一部の実施形態では、低下のレベルは、1 倍～2 0 倍の間である。

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態では、P U F R N A 結合性タンパク質は、配列番号 4 4 4 ～4 5 1、4 6 1、5 7 0、または 6 3 8 ～6 4 9 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態では、P U F R N A 結合性タンパク質は、配列番号 4 4 4 に示されるアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 4 2 】

一部の実施形態では、毒性標的 C U G R N A リピート配列は、配列番号 4 5 3 ～4 5 6 のいずれか 1 つを含む。

【 0 0 4 3 】

一部の実施形態では、毒性標的 C U G R N A リピート配列は、配列番号 4 5 4 を含む。

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態では、C U G 標的化 P U F タンパク質は、配列番号 4 5 2 に示される核酸配列によってコードされる。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、P U F または P U M B Y タンパク質は、ヒト P U F または P U M B Y タンパク質である。

30

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、P U F または P U M B Y タンパク質は、リンカー配列によって Z C 3 H 1 2 A に連結されている。

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、リンカーは、配列番号 4 1 1 で示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、核局在化配列 (N L S) および核外輸送配列 (N E S) からなる群から選択される 1 つまたは複数のシグナル配列を含む。

40

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、Z C 3 H 1 2 A ジンクフィンガーヌクレアーゼは、配列番号 3 5 8 または配列番号 3 5 9 で示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 5 5 9 ～5 6 7 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、配列番号 4 6 0、配列番号 5 1 6、または配列番号 5 1 7 を含む核酸配列によってコードされる。

【 0 0 5 2 】

50

一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸分子は、プロモーターを含む。

【0053】

一部の実施形態では、プロモーターは、t C A G プロモーターである。

【0054】

本開示は、前述の組成物のいずれかを含むベクターを提供する。

【0055】

一部の実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、およびデンドリマーからなる群から選択される。一部の実施形態では、ベクターは、AAVベクターである。一部の実施形態では、AAVベクターは、AAV9またはAAVrh74である。

10

【0056】

本開示は、本開示のベクターを含む細胞を提供する。

【0057】

哺乳動物における筋強直性ジストロフィー1型（DM1）を処置する方法であって、哺乳動物の組織における毒性標的CUGマイクロサテライトリピート伸長（MRE）RNA配列に組成物を投与するステップを含み、組成物が、a）毒性標的CUG RNAリピート配列に結合することができるPUF RNA結合性タンパク質と、b）毒性標的CUG RNAリピート配列を切断することができるエンドヌクレアーゼとを含むガイドされないRNA結合性融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、それによって毒性標的RNAの発現レベルが低下される方法が、本明細書に開示される。

20

【0058】

一部の実施形態では、PUF RNA結合性タンパク質は、配列番号444～451、461、570、または638～649のいずれか1つを含む。

【0059】

一部の実施形態では、PUF RNA結合性タンパク質は、配列番号444を含む。

【0060】

一部の実施形態では、毒性標的CUG RNAリピート配列は、配列番号453～456のいずれか1つを含む。

【0061】

一部の実施形態では、毒性標的CUG RNAリピート配列は、配列番号453を含む。

30

【0062】

一部の実施形態では、組成物は、静脈内投与によって哺乳動物の組織に投与される。

【0063】

一部の実施形態では、毒性標的RNAの発現レベルの低下によって、哺乳動物におけるDM1の症状が好転する。

【0064】

一部の実施形態では、毒性標的RNAの発現レベルは、未処置毒性標的CUG RNAの発現レベルの低下と比較して低下される。

【0065】

一部の実施形態では、低下のレベルは、1倍～20倍の間である。

40

【0066】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、ZC3H12Aジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのドメインである。

【0067】

一部の実施形態では、ZC3H12Aジンクフィンガーヌクレアーゼは、配列番号358または配列番号359で示されるアミノ酸配列を含む。

【0068】

一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸配列は、プロモーターを含む。

【0069】

50

【 0 0 7 0 】

【 0 0 7 1 】

【 0 0 7 2 】

【 0 0 7 3 】

10

【 0 0 7 4 】

20

【 0 0 7 5 】

30

40

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

50

では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、RNAを切断する様式でRNAと会合することができる。一実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、ZC3H12Aジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインである。

【0078】

一部の実施形態では、CasまたはdCas系をコードする核酸は、プロモーターを含む。一部の実施形態では、プロモーターは、EFSプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、筋肉特異的プロモーターである。一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、デスミンプロモーター（全長または短縮型された）である。

【0079】

前述の組成物のいずれかを含むベクターが、本明細書に開示される。

10

【0080】

別の実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、およびデンドリマーからなる群から選択される。

【0081】

別の実施形態では、ベクターは、AAVベクターである。

【0082】

別の実施形態では、AAVベクターは、AAV9またはAAVrh74である。

【0083】

ベクターを含む細胞が、本明細書に開示される。

20

【0084】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも1つの図面を含有する。カラーの図面（複数可）を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】図1は、本明細書に開示されるCUG標的化Cas13d組成物およびPUF組成物の例示的な実施形態がDM1毒性CUGリピートを破壊することを実証する、CUG⁹⁶⁰qPCRアッセイの結果を示す。Cas13dに基づく系(Cas13d-L1と表示されているもの)における毒性リピートの低減が、3つの異なるガイドCUG-g1、CUG-g2、およびCUG-g3を使用して示されている。PUFに基づく系における毒性リピートの低減が、PUF(CUG)-E17融合タンパク質(CUG-f1と表示されている)およびE17-PUF(CUG)融合タンパク質(CUG-f2と表示されている)をコードする例示的な核酸分子を使用して示されている。E17は、ZC3H12Aエンドヌクレアーゼのドメインである。結果は、非標的化対照に対して正規化され、生物学的反復実験(n=2)の平均+/-s.d.として示されている。

30

【0086】

【図2】図2は、非標的化対照と比較して本明細書に開示される例示的なCUG標的化Cas13dおよびPUF組成物でのRNA蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)アッセイの結果を示す。

40

【0087】

【図3】図3は、RCas9系と比較して、本明細書に開示されるCas13d組成物およびPUF組成物を使用するDM1毒性CUGリピートRNAの分解を実証する、CUG⁹⁶⁰qPCRアッセイの結果を示す。結果は、非標的化対照に対して正規化されたものであり、生物学的反復実験(n=2)の平均+/-s.d.として示されている。

【0088】

【図4】図4A~Cは、本明細書に開示されるDM1遺伝子治療用組成物の例示的なベクター構成を示す。図4Aは、短縮型CAGプロモーター(tcAG)に作動可能に連結されているCUG標的化PUF-E17を含む、DM1遺伝子治療用構築物の構成を例示する。図4Bは、E17と融合している、CUGを標的とする触媒的に不活なCas13d

50

と、EFSプロモーターに作動可能に連結されている対応するガイドとを含む、DM1遺伝子治療用構築物の構成を例示する。図4Cは、CUG標的化Cas13dと、EFSプロモーターに作動可能に連結されている対応するガイドとを含む、DM1遺伝子治療用構築物の構成を例示する。

【0089】

【図5】図5は、CUG標的化PUFとヒトPUM1のアラインメントを、ミスマッチを強調して描示する。

【0090】

【図6】図6A～Bは、CUG⁹⁶⁰アッセイの結果を示す。図6Aは、DMPK-CUG⁹⁶⁰レポーターmRNAのノックダウンを示す。具体的には、Cas13d-CUG(A01215)は、CosM6細胞におけるCUG⁹⁶⁰リピーターmRNA発現を減少させる。CUG⁹⁶⁰リピーターmRNAのレベル(ヒトDMPKエクソン11～15との関連では、参照遺伝子GAPDHおよびトランスフェクション対照GFP(CUG⁹⁶⁰と同じプラスミドから発現された)に対して正規化されている。データは、Cas13d非標的化(NT)陰性対照(異なる実験n=3)でトランスフェクトされた細胞と比べて、Cas13d-CUGでトランスフェクトされた細胞の変化倍率として表されている。図6Bは、内因性DMPK mRNAが保存されることを示す。具体的には、Cas13d-CUGは、HEK293細胞において正常DMPK mRNAレベルを低下させなかったが、リピーターランキン領域を標的とするCas13d-DMPK陽性対照は、全DMPK mRNAを58%ノックダウンした。

10

20

【0091】

【図7】図7は、DM1遺伝子治療の2つの作用機序：1)リピーター分解、および2)リピーター遮断を描示する。

【0092】

【図8】図8は、AAV9ベクターにパッケージングされた本明細書に開示されるDM1AAVに基づく遺伝子治療用組成物の3つの異なる実施形態を示す。具体的には、図8は、1)同族CUG標的化gRNAを有するCRISPR/Cas13d系に基づく反復CUGの分解のための治療用構築物A01215、2)反復CUG RNAを標的とするようにおよび切断するように操作されたヒトエンドヌクレアーゼドメイン(E17)と融合したPUF(ヒトPUM1由来)タンパク質に基づく反復CUGの分解のための治療用構築物A01344、および3)反復CUG RNAを標的とするようにおよび結合する(しかし切断しない)ように操作されたPUF(ヒトPUM1由来)タンパク質に基づく治療用構築物A01686を描示する。

30

【0093】

【図9】図9A～Bは、患者筋肉細胞における核内CUG^{exP}凝集体(foci)の低減を示す。図9Aは、GFP(A01475-対照)、Cas13d-CUG(A01215)、またはPUF(CUG)-E17(A01344)をコードする改変されたAAVrh74(eAAV)で処置されたDM1患者筋細胞(2600のCUGリピーター)における核内CUG^{exP}RNA凝集体を評価するためのRNA-FISHを示す。図9Bは、A01215(Cas13d-CUG)およびA01344(PUF(CUG)-E17)での毒性CUG RNA凝集体の用量依存的低減を実証する、eAAV-GFP(A01475-対照)に対して正規化された核内CUG^{exP}RNA凝集体の数についてのRNA-FISH定量化を示す。

40

【0094】

【図10-1】図10A～Gは、HSA_{LR} DM1マウスにおけるCUG^{exP}RNAの分解ならびにDM1関連ミスプライシングおよび筋強直の修正を示す。図10Aは、AAVに基づくA01215(Cas13d-CUG)およびA01344(PUF(CUG)-E17)により媒介されるCUG^{exP}分解ならびに選択的プライシングおよび筋強直のその後の修正についての作用機序を描示する。図10Bは、対側前脛骨筋(TA)におけるビヒクルおよび処置薬の注射を示す注射スキームを描示する。図10Cは、

50

RNA-FISHを使用しCAG10プローブを用いて、処置されたTA筋における核内CUG^exPRNA凝集体の低減を示す。図10Dは、RT-ddPCRを使用して、AAV9に基づくA01344(PUF(CUG)-E17)でのHSA-CUG^exPRNAの用量依存性減少を示す。図10E~Fは、半定量的RT-PCR、続いてキャピラリー電気泳動を使用して、DM1関連Atp2a1エクソン22およびCln1エクソン7aの選択的スプライシングの修正をそれぞれ示す。図10Gは、針筋電図検査(EMG)を使用して筋強直性運動を生じさせる結果となる針挿入の%として表された筋強直の低減を示す。

【図10-2】同上。

【図10-3】同上。

【0095】

【図11-1】図11A~Gは、HSA^{LR} DM1マウスにおけるCUG^exPRNAの遮断ならびにDM1関連ミスプライシングおよび筋強直の修正を示す。図11Aは、AAV9に基づくA01686(PUF(CUG))により媒介されるCUG^exPRNA遮断ならびに選択的スプライシングおよび筋強直のその後の修正についての作用機序を描示する。図11Bは、対側前脛骨筋(TA)におけるビヒクルおよび処置薬の注射を示す注射スキームを描示する。図11Cは、RNA-FISHを使用しCAG10プローブを用いて、処置されたTA筋における核内CUG^exPRNA凝集体の低減を示す。図11Dは、RT-ddPCRを使用して、AAV9に基づくA01686(PUF(CUG))でのHSA-CUG^exPRNAの用量依存性減少を示す。図11E~Fは、半定量的RT-PCR、続いてキャピラリー電気泳動を使用して、DM1関連Atp2a1エクソン22およびCln1エクソン7aの選択的スプライシングの修正をそれぞれ示す。図11Gは、針筋電図検査(EMG)を使用して筋強直性運動を生じさせる結果となる針挿入の%として表された筋強直の低減を示す。

【図11-2】同上。

【図11-3】同上。

【0096】

【図12】図12A~Bは、本明細書に開示されるDM1遮断(切断を伴わない)遺伝子治療用組成物の例示的なベクター構成を描示する。図12Aは、いくつかのPUF(CUG)実施形態を示し、図12Bは、いくつかのdCas13d(CUG)実施形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0097】

詳細な説明

本開示は、筋強直性ジストロフィー1型(DM1)を処置するためのRNA標的化遺伝子治療用組成物およびRNA標的化遺伝子治療方法を提供する。

【0098】

DM1は、DMPK遺伝子の3'非翻訳領域におけるCTGマイクロサテライトリピート伸長(MRE)によって引き起こされる多臓器型の常染色体優性遺伝性障害である。CUGリピート伸長を含有するRNA転写物は、胎児から成人アイソフォームへの選択的スプライシングスイッチの調節因子である筋盲様(MBNL)タンパク質を隔離する。成人DM1患者は、衰弱性筋強直および骨格筋の進行性脱力を経験するが、生まれつきDM1(先天性DMまたはCDM)の乳児は、低緊張であり、呼吸不全を示す。DMPK遺伝子は、筋肉、心臓および脳細胞に関与すると考えられている、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼと呼ばれるタンパク質をコードする。このタンパク質は、細胞内の通信に関与し得る。このタンパク質はまた、他のタンパク質と相互作用することによって筋肉細胞内の重要な構造の産生および機能を調節するようである。例えば、筋強直性ジストロフィープロテインキナーゼは、ミオシンホスファターゼと呼ばれる筋肉タンパク質の一部を阻害することが示されている。ミオシンホスファターゼは、筋肉の緊張(収縮)および弛緩に関与する酵素である。DMPK遺伝子の1つの領域は、何度も反復される3つのDN

10

20

30

40

50

A 基本単位（ヌクレオチド）からなるセグメントを含有する。この配列は、C T G と記載され、トリプレットまたはトリヌクレオチドリピートと呼ばれる。大部分の非罹患患者では、この遺伝子における C T G リピートの数は、5 ～ 34 の範囲である。D M 1 患者には、D M P K 遺伝子における C T G リピートのサイズを増加させる C T G リピート伸長がある。D M 1 は、成人発症型または先天型のどちらかとして分類され、これらは、伸長された C T G トラクトのサイズにより区別される。このような C T G リピート伸長におけるリピートは、大部分の細胞では約 50 ～ 約 1,000 C T G リピートの範囲であり得、筋肉細胞などのある特定細胞型では、典型的にリピート数が、より多い。実際に、トリヌクレオチドリピート伸長のサイズは、D M 1 の徴候および症状の重症度に関連している。筋力低下および筋消耗などの古典的特徴は成人期より、そして 1 細胞当たり約 100 ～ 約 1,000 の C T G リピートと相関する。より重症度の高い先天型の D M 1 は、1 細胞当たり 1,000 を超える C T G リピートと相関する傾向がある。軽症型の D M 1 は、典型的に、1 細胞当たり約 50 ～ 約 150 C T G リピートの範囲である。D M 1 は、成人発症型または先天型のどちらかとして分類され、これらは、伸長された C T G トラクトのサイズにより区別される。D M P K 遺伝子座によって産生される反復 R N A は、核内 R N A 凝集体を形成し、この核内 R N A 凝集体は、M B N L 1（筋盲様スプライシング調節因子 1）などの R N A 結合性タンパク質を隔離し、それらを、それらの恒常性 R N A プロセシング活性からそらす。M B N L 1 機能の喪失は、多かれ少なかれ患者死亡率に寄与する、何百もの選択的スプライシング異常および呼吸不全と関連している。C U G リピートの標的化および消失（または遮断）は、D M 1 の治療戦略である。

10

20

【0099】

本明細書に開示される遺伝子治療用組成物は、D M 1 を処置する方法において毒性 C U G リピートの効果的な切断または遮断を提供する。R C a s 9 系を使用する過去の研究を基に、R C a s 9 系成分に頼らない複数の R N A 結合性の系が本明細書に開示される。C a s 9 に基づく R N A 標的化系（R C a s 9）は、マウスにおいて、毒性 C U G リピート R N A を特異的に標的とすることおよび成人発症性筋強直性ジストロフィーの D M 1 に関連する疾患表現型の長期修復を提供することができるが、本明細書に開示される非 C a s 9 R N A 結合性の系は、毒性 C U G リピート R N A の効率的切断または遮断を提供する。C U G M R E を標的とするこのような非 C a s 9 R N A 結合性の系は、治療用の系の製造規模の調整に重要である。特に、非 C a s 9 系成分は、ユニタリー（単一）ベクターに頼れるほど小さいサイズである。本明細書に開示される非 R C a s 9 系は、R C a s 9 系と比較して毒性 C U G リピートの有効なノックダウンまたは遮断を達成することができ、非 R C a s 9 系は、免疫原性の扱いにくい C a s 9 成分によって誘発される一切の有害な免疫応答を回避するためにも重要である。

30

【0100】

D M 1 を処置するための、毒性 C U G リピート R N A に結合することができる非 C a s 9 R N A 結合性の系をコードする核酸分子を含む組成物、およびそれを含むベクターが、本明細書に開示される。そのような組成物は、毒性 C U G リピートをノックダウン／分解または遮断のどちらかの標的とすることができ、そのどちらかのために毒性 C U G リピートに結合することができ、両方の機序（分解および遮断）によって、M B N L 隔離、選択的スプライシングおよび筋強直の修正が起こる。実際に、一実施形態では、P U F（C U G）を含む遺伝子治療用遮断性組成物は、C U G^{exP} R N A に直接結合し、M B N L 隔離を阻止して、ほぼ正常な遊離 M B N L レベルおよび機能を保存することになり、これによって、D M 1 疾患表現型、例えば、スプライシング機能障害、筋強直などが回復することになる。一部の態様では、C A G リピート R N A の遮断に好適な組成物は、C U G リピート含有 R N A に結合し、C U G リピート R N A の翻訳を防止する。一部の態様では、この翻訳防止は、C U G リピート含有 R N A 配列からのタンパク質発現の低下を誘導する結果となる。本明細書に開示されるこれらの系は、R N A によりガイドされる R N a s e C a s またはガイドされない P U F、P U M B Y もしくは P P R タンパク質配置（c o n f i g u r a t i o n）を含む。

40

50

【0101】

一部の実施形態では、ガイドされるまたはガイドされないCUGリピート標的化系は、CUGリピートがCUG⁵⁰であるかまたはそれより多い、伸長されたCUGリピート(CUG^{exp})を標的とする。一部の実施形態では、CUGリピートは、CUG¹⁰⁰であるかまたはそれより多い。一部の態様では、CUGリピートは、CUG⁵⁰⁰であるかまたはそれより多い。一部の態様では、CUGリピートは、CUG⁹⁶⁰である。一部の態様では、CUG¹⁰⁰⁰リピートは、1000 CUGリピートであるかまたはそれより多い。明確にするために、CUG⁵⁰またはCUG¹⁰⁰またはCUG⁹⁶⁰またはCUG¹⁰⁰⁰は、CUGリピート含有遺伝子における50のCUGリピートまたは100のCUGリピートまたは960のCUGリピートまたは1000のCUGリピートをそれぞれ指す。50、55、60、65、70、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、90、95、100、105、110、115、120、150、180、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、960、1000 CUGリピート、またはその間の任意の他の数のCUGリピートを含む、任意の他の数または範囲のCUGリピートが可能である。

10

【0102】

DM1を処置するための前述のまたは以降のRNA標的化組成物のいずれにおいても、特定のRNA標的化組成物の文脈で記載されるいずれかの特定の構築物エレメント（例えば、リンカー、プロモーター、シグナル配列など）を、同じエレメントタイプ（例えば、リンカー、プロモーター、シグナル配列など）の別のものの代わりに用いることができる。一部の実施形態では、いずれかの特定の構築物エレメント（例えば、タグ配列）を、削除または除去することができる。言い換えると、本明細書に記載されるいずれの特定の遺伝子治療用組成物におけるエレメントの例示的な組合せも、限定することを意図したものではない。

20

RNAによりガイドされるCUGリピートRNA結合性の系

【0103】

一部の実施形態では、非Cas9結合性の系は、RNAによりガイドされるRNA結合性ポリペプチドで構成される。一部の実施形態では、核酸配列は、RNase Casタンパク質（または不活性化RNase Casタンパク質）である、RNAによりガイドされるRNA結合性ポリペプチドをコードする。一部の実施形態では、核酸配列は、毒性標的CUGリピートRNAに結合するスペーサー配列と、RNase Casタンパク質に結合するダイレトリート(DR)配列とを含む、gRNA配列をさらに含む。一実施形態では、Cas13d(CUG)系は、触媒として活性であり、この場合、Cas13d核タンパク質複合体は、毒性RNA CUGリピートを切断し、破壊する。別の実施形態では、Cas13d(CUG)系は、触媒として不活性であり、この場合、Cas13d核タンパク質複合体は、RNA CUGリピートに結合し、それを遮断する（切断しない）。さらに別の実施形態では、Cas13d(CUG)は、毒性RNA CUGリピートを切断することができるエンドヌクレアーゼと融合した、触媒として不活性なCas13d(CUG)を含む。そのような実施形態では、エンドヌクレアーゼは、活性RNaseである。RNase活性を有する例示的なエンドヌクレアーゼは、本明細書中で見つけることができ、これらは、例えば、ZC3H12Aジンクフィンガー（本明細書ではE17とも呼ばれる）またはPINエンドヌクレアーゼからのドメインを含む。一部の実施形態では、CUGリピート標的化組成物をコードする核酸配列は、Cas13dタンパク質またはCas13d融合タンパク質の発現を制御する第1のプロモーター配列、および少なくとも1つのガイドRNA配列の発現を制御する第2のプロモーター配列を含む。

30

40

【0104】

表1: DMIを処置するためのRNase Cas系によるCUG標的化のためにsgRNAにおいて使用される例示的なスペーサー配列:

スパーサー	スパーサー配列
1	agcagcagcagcagcagcagcagcagcagc (配列番号 457)
2	gcagcagcagcagcagcagcagcagcagc (配列番号 458)
3	cagcagcagcagcagcagcagcagcagca (配列番号 459)

【 0 1 0 5 】

一実施形態では、RNase Casタンパク質は、Cas13タンパク質である。別の実施形態では、Cas13タンパク質は、Cas13dタンパク質である。別の実施形態では、Cas13dタンパク質は、不活性化RNase Cas13dタンパク質(dCas13d)である。別の実施形態では、dCas13dタンパク質は、1) dCas13dと、2) ヌクレアーゼ活性を有するタンパク質またはその断片をコードするポリペプチドとを含む、融合タンパク質である。別の実施形態では、dCas13dタンパク質は、1) dCas13dと、2) ZC3H12A、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼまたはその短縮型(本明細書ではE17または配列番号358とも呼ばれる)とを含む、融合タンパク質である。一部の実施形態では、Cas構成は、シグナル配列、例えば、NLSおよび／またはNESを含む。一部の実施形態では、dCas13dは、リンカー配列を介してE17エンドヌクレアーゼに連結されている。一実施形態では、リンカー配列は、VDTAGS(配列番号411)である。一部の実施形態では、Cas13dまたはdCas13d融合タンパク質は、プロモーター配列に作動可能に連結されている。一部の実施形態では、プロモーター配列は、エンハンサーおよび／またはイントロンを含む。一部の実施形態では、プロモーター配列は、EFSプロモーター配列である(図4Bおよび4C)。

【 0 1 0 6 】

一部の実施形態では、本開示のCUGリピート標的化cas13dまたはdCas13dタンパク質は、N末端からC末端へ、Cas13d (Seq 212)、リンカー、およびSV-40 NLSを含む。一部の態様では、本開示のCUGリピート標的化dCas13dタンパク質は、CUGリピートRNA配列伸長を遮断する方法に使用される。短縮型デスンプロモーターを有する活性Cas13d (Seq 212) (A02207)

【表 5 4 - 1】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
Cast3d Seq212	KKKHQSAAEKRQVKLKNQEKAQKYASEPSPLQSDTAGVECSQKKTVVSHIASSKT LAKAMGLKSTLVMGDKLVITSFAASKAVGGAGYKSANIEKITDLQGRVIEEHMFMF ADVGEKNIELSKNDCHTNVNNPVVTNIGKDYIGLSRLEQEFFGKTFFENDNLHVQLA YNILDIKKILGTYNNNIYIFYNLNRAGTGRDERMYDDLIGTLTYAYKPMEAQQTYLLK GDKDMRRFEEVKQLLQNTSAYYVYYGTLFEKVKAKSKKEQRAKEAIDACTAHNY DVLRLLSLMRQLCMHSVAGTAFKLAESALFNIEDVLSADLKEILDEAFSGAVNKLND GFVQHSGNNLYVLQQLYPNETIERIAEKYYRLTVRKEDLNMGVNIKKLRELIVGQYF PEVLDKKEYDL SKNGDSVVTYRSKIY TVMNYILL YLEDHDSRESMVEALRQNR DEGKEEIYRQFAKKVWNGVSGLFGVCLNLFKTEKRNKFRSKVALPDVSGAAYMLSS ENIDYFVKMLFFVCKFLDGKEINELLCALINKFDNIADILDAAAQCGSSVWFVDSYRF FERSRRISAQIRIVKNIAASKDFKSKSKDPSDESYPEOLYLDALALLGDVISKYKONRDG

【表 5 4 - 2】

	SVVIDDQGNVLTQYKRFYEFFEIEIKRDESGGIKYKKS GKPEYNHQRNFILNNV LKSKWFFYVVKYNRPSSCRELMKNKEILRFVLRDIPDSQVRRYFKAVQGEEAYASAE AMRTRLVDALSQFSVTACLDEVGGMTDKEFASQRAVDSKEKLRAIIRLYLTVAYLIT KSMVKVNTRFSAFVLERDYLLIDGKKKSSDYTGEDMLALTRKFVGEDAGLYRE WKEKNAEAKDKYFDKAERKKVLRQNDKMIKMHFTPHSLNYVQKNLESVQSNGL AAVIKEYRNAVAHLNIINRLDEYIGSARADSYSLYCYCLQMYLSKNFSVGYLINVQ KQLEEHHTYMKDLMWLLNIPFAYNLARYKNLSNEKLFYDEEAAAEEKADKAENERG E (配列番号 572)
リンカー	GS
SV-40 NLS	PKKKRKV (配列番号 571)

10

ガイドされない CUG リピーター RNA 結合性の系

【0107】

一部の実施形態では、非 Cas9 RNA 結合性の系は、RNA によりガイドされる RNA 結合性ポリペプチドを含まない。代わりに、非 Cas9 RNA 結合性の系は、RNA によりガイドされない RNA 結合性ポリペプチド、例えば PUF タンパク質もしくは PUMBY タンパク質、またはその RNA 結合性部分で構成されている。一実施形態では、本明細書に開示されるガイドされない RNA 結合性融合タンパク質は、a) UGCUGCUG (配列番号 453) を含む毒性標的 CUG リピーター配列に結合することができる PUF または PUMBY RNA 結合性配列と、b) 毒性標的 CUG リピーター配列を切断することができるエンドヌクレアーゼとを含む。

20

【0108】

一実施形態では、標的 RNA 配列は、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 454)、UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 455)、および UGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 456) からなる群から選択される。

【0109】

一実施形態では、標的 RNA 配列は、CUGCUGCUCU (配列番号 472)、CUGCUGCUGCUGCUCU (配列番号 473)、CUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 474)、および CUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 475) からなる群から選択される。

【0110】

一実施形態では、標的 RNA 配列は、GCUGCUGC (配列番号 476)、GCUGCUGCUGCUGC (配列番号 477)、GCUGCUGCUGCUGCUGCUCU (配列番号 478)、および GCUGCUGCUGCUGCUGCUGCUGC (配列番号 479) からなる群から選択される。

30

【0111】

一実施形態では、PUF または PUMBY RNA 結合性融合タンパク質は、a) PUF または PUMBY CUG 標的化タンパク質と、b) ZC3H12A、ジンクフィンガーエンドヌクレアーゼまたはその切断型（本明細書では E17 または配列番号 358 と呼ばれる）とを含む。一部の実施形態では、CUG 標的化 PUF または PUMBY 融合タンパク質は、N 末端から C 末端へ、以下のとおりに構成される：

40

【0112】

PUF (CUG) - E17

【0113】

E17 - PUF (CUG)

【0114】

PUMBY (CUG) - E17 または

【0115】

E17 - PUMBY (CUG)。

【0116】

一部の実施形態では、PUF または PUMBY 融合構成は、PUF (CUG) または P

50

UMBY (CUG) と E17 の間にリンカーを含む。一実施形態では、リンカー配列は、VDTANGS (配列番号 411) である。

【0117】

一部の実施形態では、リンカーを含む、CUG 標的化 PUF または PUMBY 融合タンパク質は、N 末端から C 末端へ、以下のとおりに構成される：

【0118】

PUF (CUG) - リンカー - E17

【0119】

E17 - リンカー - PUF (CUG)

【0120】

PUMBY (CUG) - リンカー - E17 または

【0121】

E17 - リンカー - PUMBY (CUG)。

【0122】

PUF (CUG) - リンカー - E17 の N から C 末端への配向の例示的な実施形態は、PUF (CUG) - E17 として N から C 末端へ配向されている図 1 の第 1 の配向 CUG フレーム (CUG - f1) である。E17 - リンカー - PUF (CUG) の N から C 末端への配向の例示的な実施形態は、E17 - リンカー - PUF (CUG) として N から C 末端へ配向されている図 1 の第 2 の配向 CUG フレーム (CUG - f2) である。

【0123】

一実施形態では、CUG 標的化 PUF または PUMBY 融合タンパク質構成は、N 末端から C 末端へ、PUF (CUG) - VDTANGS - E17 または PUMBY (CUG) - VDTANGS - E17 である。別の実施形態では、CUG 標的化 PUF または PUMBY 融合タンパク質構成は、N 末端から C 末端へ、E17 - VDTANGS - PUF (CUG) または E17 - VDTANGS - PUMBY (CUG) である。

【0124】

一部の実施形態では、PUF または PUMBY 構成は、1 つまたは複数のタグまたはシグナル配列および／またはタグ、例えば、FLAG、NLS、NES またはこれらの組合せを含む。一実施形態では、FLAG タグ配列は、DYKDDDDK (配列番号 436) である。一実施形態では、NLS シグナル配列は、ヒト NLS である。一実施形態では、NES は、ヒト NES である。一実施形態では、NLS は、SV40 NLS である。別の実施形態では、SV40 NLS 配列は、PKKKRKV (配列番号 437) である。一実施形態では、構成は、2 つの異なるタグおよび／またはシグナル配列を含む。別の実施形態では、構成は、2 つまたはそれより多くのシグナル配列を含む。一部の実施形態では、タグおよび／またはシグナルは、N 末端に位置する。一部の実施形態では、タグおよび／またはシグナルは、C 末端に位置する。一部の実施形態では、あるタグおよび／またはシグナルは、N 末端に位置し、あるタグおよび／またはシグナルは、C 末端に位置する。一実施形態では、1 つまたは複数のタグおよび／またはシグナルを含む、CUG 標的化 PUF または PUMBY 融合タンパク質は、N 末端から C 末端へ、以下のとおりに構成される：

【0125】

FLAG - NLS - PUF (CUG) - リンカー - E17 ; または

【0126】

FLAG - NLS - PUMBY (CUG) - リンカー - E17 ;

【0127】

NLS - PUF (CUG) - リンカー - E17 ; または

【0128】

NLS - PUMBY (CUG) - リンカー - E17。

【0129】

一実施形態では、1 つまたは複数のタグおよび／またはシグナルを含む、CUG 標的化

10

20

30

40

50

P U F または P U M B Y 融合タンパク質は、N 末端から C 末端へ、以下のとおりに構成される：

【0130】

FLAG-NLS-PUF (CUG) - VDTANGS - E17 ; または

【0131】

FLAG-NLS-PUMBY (CUG) - VDTANGS - E17 ;

【0132】

NLS-PUF (CUG) - VDTANGS - E17 ; または

【0133】

NLS-PUMBY (CUG) - VDTANGS - E17。

10

【0134】

表 2 A ~ 2 B : C U G M R E を標的とするための例示的な P U F 構成：

【0135】

C U G (D M 1) を分解の標的とする、エンドヌクレアーゼを伴う P U F :

【表 5 5】

タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFのアミノ酸配列
8PUF	N末端SV40 NLS; PUFとE17エンドヌクレアーゼの間の リンカー (VDTANGS); C末端E17	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHI MEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQ LVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQK FFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLAL QMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVR ELDGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIEC VQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYG NRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHT EQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDK SKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEK CVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH SALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKH ILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)

20

30

【0136】

C U G (D M 1) を遮断の標的とする、エンドヌクレアーゼを伴わない P U F :

【表 5 6】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	アミノ酸配列
A01685	8PUF	N末端Rb NLS、 NLSと8PUFの 間のリンカー	UGCUGC UG (配列 番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEF SQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEIL QAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQK LALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKAL EFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNG SYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFA LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEEL HQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPED KSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKC VTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALY TMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYY MKNGVDLG (配列番号 444)

40

【0137】

一部の実施形態では、C U G 標的化 P U F タンパク質を含む本開示の A A V ベクターは、5' から 3' へ、表 A に示されるように構成されている。一部の態様では、A A V ベクタ 50

ーは、配列番号 573 または 574 で示される核酸配列を含む。

【0138】

表 A: デスミン (FL) プロモーターを有する PUF-CUG-E17 (A02205)

【表 A】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGS
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIRGHVLSLALQM YGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQCVQP QSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLV QDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYANYVVQKMDVAEPGQR KIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)
リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
E17	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLA VNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKILVFTPSRRV GGKRVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDQGERQEWKRFEIERLLMY SFVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

20

【0139】

一実施形態では、PUF (CUG) または PUMBY (CUG) 融合構築物またはエンドヌクレアーゼなしの PUF (CUG) または PUMBY (CUG) をコードする核酸は、細胞における発現のためにプロモーター配列に作動可能に連結されている。一実施形態では、プロモーター配列は、短縮型 CAG (tCAG) プロモーターである (図 4A)。一部の実施形態では、プロモーター配列は、エンハンサー配列および／またはイントロン配列を含む。一実施形態では、プロモーターは、EFS / UBB プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、筋肉特異的プロモーターである。

【0140】

一実施形態では、PUF (CUG) (エンドヌクレアーゼありまたはなし)、Cas13d (CUG) または dCas13d (CUG) (エンドヌクレアーゼを有するまたは有さない dCas13d (CUG)) をコードする核酸は、細胞における発現のためにプロモーター配列に作動可能に連結されている (図 4B ~ 4C および図 12B)。一実施形態では、プロモーター配列は、EFS プロモーターである (図 4B ~ 4C)。一実施形態では、プロモーターは、EFS / UBB プロモーターである (図 12B)。一部の実施形態では、プロモーター配列は、エンハンサー配列および／またはイントロン配列を含む。一部の実施形態では、プロモーター配列は、筋肉特異的プロモーターである (図 12B)。

30

【0141】

一部の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、以下のようなデスミンプロモーターである：

40

【0142】

筋肉特異的デスミンプロモーターの配列：

50

【表 58】

ヒトデスミン (FL)	taacccctgccccacagctcctcctcgtgcttgggttccagccatgcgttctcctataaaacccgctcgttattggggttggcagctg ttgctgccaggagatggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacccctggtgtgtgtggcggtgggtgtgtgagtaggggg atgaatcaggagggggcA ggggacccagggggagggcagccacacaaagtcgtgctgggggtgggagcgcacatagcaattggaaa ctgaaagcttatcagacccttctggaaatcagccactgtttataaacttgaggccccaccctcgacagtaccggggagggaaggggcctg cactagtcagagggaactgaggctcagggcCagctcggccatagacalacalggcaggcagcttggccaggatccctccgctgcc agggctcctcctgcccctcctcctgctcagagacccccaccctcaagcctggctgtgttggcctgagacccaacctcttcgactcaagag aatatttaggaacaagggtttagggccttccctgggaacaggccttgacctttaggaatgacccaagtcctccttgacccaaaagggg accctcaactaaagggaagcctctcttctgtgtcctcctgacccactccccccacccagggagggagataaccagggtgaaag agggccgctggggctgcagacatgcttgcctgcccctggcgaaggattggcaggcttggcgtcagaggccccgctggctgact caggggcgaggcctTtgggggggagctggcctccccccccacggccacgggcggccttctcctggcaggacaggggactctgc agctgacggggaggggaggcggggcctgagtcaggagggaataatagtcggagggcctggggggcctGTCTCCCTCG CCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGGCCCGCCAGCC TCGCCCG (配列番号 568)
ヒト短縮型デスミン (デスミン)	ACCCATGCCCTCCTCAGGTACCCCTGCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCCTGTTTCC CAGCCATGCGTTCTCCTCTATAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTG CTGCCAGGGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAACACAAACCCCTGGT GTGTGTGGGCGTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGGcAGGGGAC CACGGGGGcAGGAGCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATT GGAACTGAAAGCTTATCAGACCCCTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTG AGGCCCCACCCCTCGAGATAACCAGGGCTGAAAGAGGCCCGCCTGGGGGCTGCAGAC ATGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAGGATTGGCAGGCTTGCCCGTCACAGGACCCCCG CTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCCTTTGCGGGGGAGCTGGCTCCCCGCCCCACGG CCACGGGCCGCCCTTCTGTGGCAGGACAGCGGGATCTTGCACTGTGAGGGAGGGG AGGGGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATAAATAAGTGCCGACGGCTGGGGGGCCTGTC TCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCC CGCCAGCCTCGCCCGCGCCGTC (配列番号 569)

10

20

【0143】

別の実施形態では、PUF (CUG) または PUMBY (CUG) または Cas13d (CUG) または dCas13d (CUG) 構成は、AAVベクター内にパッケージングされる。一実施形態では、AAVベクターは、AAV9ベクターである。別の実施形態では、AAVベクターは、AAVrh74ベクターである。

【0144】

別の実施形態では、PUF (CUG) または PUMBY (CUG) または Cas13d (CUG) または dCas13d (CUG) 構成は、AAVベクター内にパッケージングされる。一実施形態では、AAVベクターは、AAV9ベクターである。別の実施形態では、AAVベクターは、AAVrh74ベクターである。

30

【0145】

一部の実施形態では、CUG標的化活性 Cas13dタンパク質を含む本開示の AAVベクターは、5' から 3' へ、表 B に示されるように構成されている。一部の態様では、AAVベクターは、配列番号 573 または 574 で示される核酸配列を含む。

表 B: 例示的な CUG 標的化 Cas13d AAVベクター

40

50

【表 B - 1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgtcgtcgtcactcagggccgcccggcgatcgggacacattggctcggccggccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggggaglggccaacccatcactaggggtccct (配列番号599)
ヒト U6 プロモーター	GAGGGCCTATTTCCCATGATTTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTTAGAGAGA TAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAA AGTAATAAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAAAATGGACTATCATATG CTTACCGTAACCTGAAAGTATTTCCGATTTCTTGCGCTTTATATATCTTTGTGGAAAGGACGAAA CACC (配列番号519)
Seq212 ダイレクト リピート (DR)	gtacaatagccctgcagtaaggcaggttctaAGAC (配列番号213)
スパーサー (CTG ガイド 3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号459)
ヒトβスミン プロモーター	ACCCATGCGCTCCTCAGGTACCCCCCTGCCCCCACAGCTCCTCTCCTGTGCCTTGTTTCCAG CCATGCGTTCTCCTCTATAAAATACCCGCTCTGGTATTTGGGGTTGGCAGCTGTTGCTGCCAG GGAGATGGTTGGGTTGACATGCGGCTCCTGACAAAAACAAACCCCTGGTGTGTGTGGGC GTGGGTGGTGTGAGTAGGGGGATGAATCAGGGAGGGGGCaGGGGACCCAGGGGGCAGGA GCCACACAAAGTCTGTGCGGGGGTGGGAGCGCACATAGCAATTGGAAGCTGAAAGCTTAT CAGACCCCTTCTGGAAATCAGCCCACTGTTTATAAACTTGAGGGCCCCACCCCTCGAGATAAC CAGGGCTGAAAGAGGCCCCGCTGGGGGCTGCAGACATGCTTGCTGCCTGCCCTGGCGAAG GATTGGCAGGCTTGCCCGTCAAGGACCCCGCTGGCTGACTCAGGGGCGCAGGCCTTTTG CGGGGGAGCTGGCCTCCCCGCCCCCACGGCCACGGGGCCGCTTTCTTGGCAGGACAGCG GGATCTTGCAGCTGTCAAGGGAGGGGAGGCGGGGGCTGATGTCAGGAGGGATATAAATAG TGCCGACGGCTGGGGGCCCTGTCTCCCCCTCGCCGCATCCACTCTCCGGCCGGCCGCTGCC CGCCGCTCCTCCGTGCGCCCGCCAGCCTCGCCCGCGCCGTC (配列番号569)
コザック配列	GCCGCCACCATG (配列番号529)
Cas13d Seq212	AAGAAGAAGCACCCAGAGCGCCGCGAGAAAGAGGCAAGTGAAAGAAGCTCAAGAATCAAGA GAAGGCCCCAGAAAGTACGCTAGCGAGCGCTTCCCCCTCCAGAGCGATACAGCTGGCGTGGA ATGCTCCCAAGAAAAAGACAGTCTGTCAGCCACATTGCCAGCTCCAAGACACTGGCCAAGGC TATGGGACTCAAAATCCACACTGGTCAATGGGCGACAAAGCTGGTCAACACAGCTTTGCTGCT AGCAAGGCTGTGCGGAGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAAATCACAGATCTG CAAGGAAGGGTCAATTGAGGAGCACGAAAGGATGTTTAGCGCCGATGTCGGAGAGAAAAA TATCGAACTGAGCAAGAATGACTGCCACACCAACGTCACAAACCCCGTGGTGACCAACAT CGGAAAGGATTACATCGGACTGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTCGGCAAGACATT CGAGAATGACAATCTGCATGTGCAGCTGGCTTACAATATCCTCGACATCAAGAAAAATTCTG GGAACCTATGTGAACAATATCATTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCGGCA GAGATGAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGG CTCAACAGACCTATCTGCTCAAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGTGAAAC AGCTGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTTCGAGAAAGGTGAA GGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGCCGAAATCGACGCTTGTACCGCCC ATAACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTCCCTCATGAGGCAGCTGTGCATGCACTCCGTCGC TGGAACAGCCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCC GATCTGAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAGCTCAATGACGGA TTCTGTGACGACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGCAGCTGTACCCTAATGAGACCA TCGAGAGAATCGCCGAGAAGTACTACAGACTCACCGTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGG GAGTCAACATTAAGAAAGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCTCTG ACAAAAGAATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTT ATACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCACGACTCCAGCAGAGAAAG CATGGTCAAGGCTCTGAGACAAAACAGAGAGGGCGATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATA GACAGTTTGCAAGAAGGTGTGGAACGGCGTGTCCGACTGTTTGGCGTGTGTCTGAACCT CTTCAAGACCGAAAAGAGAAACAAAGTTTAGGAGCAAGTCCGCCCTCCCGATGTGTCCGG CGCTGCCTATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAAGATGCTCTTCTTTGTGT GTAAGTTTCTGGATGGCAAAAGAAATCAACGAGCTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGA TAATATTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCCTCCGCTGTGTTCTGTGGACA GCTATAGGTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAACA

10

20

30

40

50

【表 B - 2】

	TCGCTTCCAAGGATTTTAAGAAATCCAAGAAGGATTCCGATGAGAGCTACCCGAGCAGC TGTATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGA TGGCAGCGTCGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTT TAGATATGAATTTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGGCGGCATCAAGTACAAGAA GTCCGGA AAAA CCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGTGCTGAA AAGCAAATGGTTTTTCTATGTGGTGAAGTACAATAGGCCAGCAGCTGCAGAGA AACTGAT GAAGAATAAGGAAATTTCTGAGGTTCTGTGCTGAGAGACATCCCCGACTCCCAAGTGAGAAG ATACTTTAAGGCCGTC AAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAGCTATGAGGACAAG ACTGGTCGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACAGCTTGTCTGGATGAAGTGGGCGGCATG ACAGACAAGGAATTCGCCTCCAGAGGGCCGTCGATAGCAAAGAAAACTGAGAGCCATC ATCAGACTGTATCTGACAGTCGCCTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAA GGTTTATGCAATTGCCTTTAGCGTGCTGGAGAGGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAGAA GAAATCCAGCGACTACACCCGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGAAAATTTGTGGGCGA AGATGCTGGACTGTATAGAGAGTGGAAAAGAGAAGAACGCTGAAGCC AAGGACA AATATTT TGACAAAGGCCGAAAAGGAAGAAAGGTGCTGAGACAGAAACGATAAGATGATCAGAAAAGATGC ACTTCACACCCCACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAATCTCGAAAGCGTCCAGAGCAACGG ACTGGCCGCCGTCATCAAGGAATATAGAAATGCCGTGCTCACCCTCAATATCATCAATAGA CTGGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCTACTACTCTCTGTACTGTTACTGCCT CCAAATGTATCTGAGCAAGAACTTCAGCGTGGGCTACCTCATCAACGTGCAAAAAGCAGCT GGAGGAGCACCAACCTACATGAAGGATCTCATGTGGCTGCTCAACATCCCTTCGCTTAC AACCTCGCCAGATACAAAATCTGTCCAACGAAAACTCTTTACGACGAGGAAGCCGCC GCCGAAAAGGCTGACAAGGCTGAGAACCAGAGAGAGGCGAA (配列番号 601)
リンカー	GGAAAGC
SV-40 NLS	CCCAAGAAGAAAAGGAAGGTC (配列番号 532)
リンカー	GGCGGAIdc
Myc タグ	GAGCAgAAACTGATTAGcGAAGAgGATCTC (配列番号 602)
WPRES	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTA TGGCTTTTCA TTTTCTCCTCTTGTATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGA ACTCATC GCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGG (配列番号 603)
SV-40 ポリA	AACTTGT TTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA ATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号 533)
3' ITR	Aggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcgcgtcgtcgtcactgagggcgccgaccaaaggtcggccgacggcggttt ggccggcgccctcagtgagcagcagcagcgcgcactgcctgcagg (配列番号 600)

10

20

【0146】

一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼと融合した CUG 標的化 PUF タンパク質を
含む、A02205 と呼ばれる、本開示の AAV ベクターは、5' から 3' へ、表 C に示さ
れるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAV ベクターは、配列番号 574 また
は 575 で示される核酸配列を含む。

表 C： 例示的な CUG 標的化 PUF - エンドヌクレアーゼ AAV ベクター A02205

【表 C - 1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CGTCGGGCGACCTTTGGTTCGCGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCA ACTCCATCACTAGGGGTTCT (配列番号 599)
ヒトデスミン プロモーター (FL)	tacccctgccccccacagctcctctcctgtgcttgttccagccatgcttctctctataaataccgctctg gtatttgggggtggcagctgtgtgctgcccaggagatgggtgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacc cctgggtgtgtgtggcggtgggtgtgtgtgagtagggggatgaatcaggagggggcAggggaccagggg gcaggagccacacaaagtctgtgcgggggtgggagcgcacatagcaattggaaactgaaagcttatcagac

40

【表 C - 2】

	cctttctggaatcagcccactgtttataaacttgaggccccaccctcgacagtaccggggagggaaggggcc tgcactagtcagaggggaaactgaggtcagggcCagctcgccatagacalacatggcaggcaggcttlg gccagatccccccgctgcccagggcgtccctgcccctcccttccctgctagagacccccaccctcaagcctg gctggtccttgcctgagacccaacccctcctgactcaagagaatattaggaaacagggtgggttagggccttcc tgggaacaggccctgaccccttaagaaatgacccaagctcctcctgacccaaaaggggaccctcaactaaa gggaagccctcctcctgctgctcctcctgacccacacccccaccagacgaggagalaaccagggtc gaaagaggcccgctggggcctgagacatgcttgcctgcccctggcgaaggattggcaggcttggccg tcacaggacccccctgctgactcaggggcgaggccctTtggggggaggctggcctccccgccccac ggccacggggcgcccttccctggcaggacagcgggatctgcagctgctcaggggaggggaggcgggggt galgtcaggagggalacaaatagtcggcagggctggggggccctGTCTCCCTCGCCGCATC CACTCTCCGGCCGGCCGCCTGCCCGCCGCCTCCTCCGTGCGCCCGC CAGCCTCGCCCG (配列番号608)	10
コザック	gccgccACCatg (配列番号529)	
Rb-NLS	Gaccgtgtgtcaaaagaagtgtgaaggaagcaaccctcctaaaccactgaaaaactacgc (配列番号604)	
リンカー	ggaGGATCG	
8PUF	GGACGAAGCCGACTCTTGGAAGACTTCAGAAACAATCGGTATCCG AACCTTCAGCTGAGAGAAATTGCTGGTCACATCATGGAATTTTCTC AAGATCAACATGGAAGCCGGTTTATTGAACTTAAACTCGAACGAG CCACCCCGGCCGAAAGGCAATTGGTGTTCAATGAAATTCTTCAGG CCGCATACCAACTCATGGTTGATGTTTTTGGGAACTATGTTATTCA AAAGTTTTTTGAGTTCGGGTCACTGGAGCAAAAGTTGGCATTGGC AGAGCGAATCCGGGGCCATGTTCTGAGCCTCGCTCTCCAAATGTA CGGTAGTTATGTCATTTCGCAAAGCACTCGAGTTCATACCATCAGAT CAACAGAATGAGATGGTGCGGGAGCTGGATGGGCATGTTTTGAAA TGCGTGAAAGACCAAAACGGTAGCTACGTAGTTGAGAAATGCATC GAATGCGTCCAACACAGTCTCTCCAATTTATTATAGATGCATTTA AGGGTCAGGTTTTTCGCGCTTTCTACGCACCCGTATGGGAACCGAGT GATTACAGAGAATCTTGGAGCACTGCCTGCCGGATCAGACACTCCC TATCTTGGAGGAATTGCACCAGCATACCGAACAATTGGTGCAAGA TCAATACGGTTCATATGTTATTTCGGCACGTTCTTGAGCATGGAAGG CCAGAGGACAAGTCAAAGATCGTCGCTGAGATTAGAGGTAACGTA TTGGTGCTCTCACAAACACAAATTTGCATCTAATGTGGTGAGAAAT GTGTTACTCATGCTTCTAGAACGGAAAGGGCAGTTCTCATAGACG AAGTTTGCACAATGAATGATGGTCCTCATAGCGCACTTTATACCAT GATGAAGGACCAGTATGCAAACTATGTCGTCCAGAAAAATGATCGA TGTGGCGGAGCCCGGTCAACGGAAAATCGTGATGCACAAAATCCG ACCTCACATTGCTACACTCAGAAAATACACGTATGGAAAACATAT TCTGGCTAAGCTGGAGAAATATTACATGAAGAATGGAGTGGATCT GGGG (配列番号452)	20
リンカー	GTGGATACTGCCAATGGCAGC (配列番号605)	
E17	Ggtggtggcaccctaaggctcccaactggagcctcactccagaagaggaaaaggaggcagcgac ctgagaccagtgtgcatcgatgggagcaacgtggccatgagccatgggaacaaggaggtcttctcctgccc ggcatcctgctggcagtgaactggttctggagcggggccacagacatcacagtgttgtgcatcctgga ggaaggagcagcctcgccccagctgcccacacagaccagcacatcctcggggaactggagaagaaga agatcctggtgttcacacatcacgacgctgggtggcaagcgggtgggtgctatgacgacagattcattgtg aagctggcctacgagtgtgacggatcgtgttccaacgacacataccgtgacctcaaggcgagcggcag gagtggaaagccttcacgaggagcggctgctcatgtactccttctcaatgacaagtattatgccccctgatgac	30
リンカー	GTGGATACTGCCAATGGCAGC (配列番号605)	
E17	Ggtggtggcaccctaaggctcccaactggagcctcactccagaagaggaaaaggaggcagcgac ctgagaccagtgtgcatcgatgggagcaacgtggccatgagccatgggaacaaggaggtcttctcctgccc ggcatcctgctggcagtgaactggttctggagcggggccacagacatcacagtgttgtgcatcctgga ggaaggagcagcctcgccccagctgcccacacagaccagcacatcctcggggaactggagaagaaga agatcctggtgttcacacatcacgacgctgggtggcaagcgggtgggtgctatgacgacagattcattgtg aagctggcctacgagtgtgacggatcgtgttccaacgacacataccgtgacctcaaggcgagcggcag gagtggaaagccttcacgaggagcggctgctcatgtactccttctcaatgacaagtattatgccccctgatgac	40

10

20

30

40

【表 C - 3】

	ccactggggccggcacggggcccagcctggacaacttctgcgtaagaagccactcactttggag (配列番号 606)
WPRE	Aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctccittacgctatgtggat acgctgctttaatgccttltatcatgclattgcttcccglatggccttcaatttctcctccttgataaatcctgggtgct gtctctttatgaggagttgtggcccgltgtcaggcaacgtggcgltgggtgtgactgtgttgcagcaacccc cactgggtggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttctgcttccccctccctallgccacggcg gaacategcgcctgcttgcctgtcccgctgtggacaggggctggcgttgggcaactgacaattccgtgggtgt gtcggggaaatcatcgtcttcttggcgtcgtcgcctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgc tacgtcccttccggccclcaatccagcggaccttccctcccgggcctgtgcgggctgtgcggccttccggc tcttgccttccggccclcagacgagtcggatctcccttggggcgcctcccgcc (配列番号 607)
SV-40 ポリ A	AACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTG TGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号 533)
3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG (配列番号 600)

10

デスミン (FL) プロモーターを有する、エンドヌクレアーゼなしの PUF-CUG (A
02239)

20

【0147】

一部の実施形態では、本開示は、表 D に示されるような RB NLS と融合した CUG
標的化 PUF タンパク質を提供する。

表 D: 例示的な CUG 標的化 8 PUF

【表 D】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGLEQKLALAEIRGHVLSLALQM YGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQVQP QSLQFIIDAFKQVVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLV QDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQR KIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)

30

【0148】

一部の実施形態では、CUG 標的化 PUF タンパク質を含む、A02239 と呼ばれる
、本開示の AAV ベクターは、5' から 3' へ、表 E に示されるようなエレメントを含む。
一部の態様では、AAV ベクターは、配列番号 576 または 577 で示される核酸配列を
含む。

40

表 E: 例示的な CUG 標的化 PUF AAV ベクター A02239

50

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG CGTCGGGCGACCTTTGGTGCCTCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCT (配列番号 599)
ヒトデスミン プロモーター (FL)	tacccctgccccacagctcctcctcctgctgcttgttccagccatgcgttctcctclataaataaccgctcgtg gtatttgggggttggcagctgtgtcgtccaggggagatggttgggttgacatgcggctcctgacaaaacacaaacc cctgtgtgtgtgtgggctgtgggtgtgtgtgagtagggggatgaalcaggaggagggggcAgggggaccaggggg gcaggagccacacaaagtctgtgcgggggttgggagcgcacatagcaattggaaactgaaagcttatcagac ccttcttggaatcagcccactgttataaactttagggccccaccctcgacagtaccggggagggaagagggcc tgcaatagtcagagggaaactgaggtcaggggcCagctcgcccatagacalacatlggcaggcaggttltg ggcagggtccctccgcttgcaggcgtctccctgcccctccctcctgctgctlagagacccccaccctcaagcctg gctggcttlttgcctgagacccaaacctctcgaactcaagagaatatttaggaacaagggtgtgtttagggccttcc tgggaacaggccttgaccttlaagaaatgacccaaagtctcctttagccaaaaaggggaccctcaaaactaaa gggaaggcctctctcgtgtcctccctgaccccaclccccccaccagggagcaggagataaccagggc gaaagaggcccgcttgggggctgcagacatgcttgcctgcccctggcgaaaggattggcaggcttgcctg tcacaggacccccgctggcgtacacagggggcgcaggcctTtgcgggggagctggcctccccgccccac ggccacggggccgcttcttgcaggacagcgggacttgcagctgtcaggggaggggagggcgggggc gatgtcaggagggaalacaaatagtgtccgacggctgggggcccGTCTCCCCCTCGCCGCATC CACTCTCCGGCCGGCCGCTGCCCCGCCGCTCTCCGTGCGCCCGC CAGCCTCGCCCG (配列番号608)
コザック	gcccgcACCAtg (配列番号529)
Rb-NLS	Gaccgtgtgtcaaaagaagtgtgaaggagcaacctcctaaaccactgaaaaactacgc (配列番号 604)
リンカー	ggaGGATCG
8' PUF	GGACGAAGCCGACTCTTGGAAGACTTCAGAAACAATCGGTATCCG AACCTTCAGCTGAGAGAAATTGCTGGTCACATCATGGAATTTTCTC AAGATCAACATGGAAGCCGGTTTATTGAACTTAACTCGAACGAG CCACCCCGGCCGAAAGGCAATTGGTGTTCAATGAAATTCTTCAGG CCGCATACCAACTCATGGTTGATGTTTTTGGGAACTATGTTATTCA AAAGTTTTTTGAGTTCGGGTCCTGGAGCAAAAGTTGGCATTGGC AGAGCGAATCCGGGGCCATGTTCTGAGCCTCGCTCTCCAAATGTA CGGTAGTTATGTCATTCGCAAAGCACTCGAGTTCATACCATCAGAT CAACAGAATGAGATGGTGCGGGAGCTGAGTAGTTGGGCATGTTTTGAAA TGCGTGAAAGACCAAAACGGTAGCTACGTAGTTGAGAAATGCATC GAATGCGTCCAACCACTGCTCTCCAATTTATTATAGATGCATTTA AGGGTCAGGTTTTTCGCGCTTTCTACGCACCCGTATGGGAACCGAGT GATTCAGAGAATCTTGAGGACTGCCTGCCGATCAGACACTCCC TATCTTGAGGAATTGCACCAGCATACCGAACAATTGGTGCAAGA TCAATACGGTTCATATGTTATTTCGGCACGTTCTTGAGCATGGAAGG CCAGAGGACAAGTCAAAGATCGTCGCTGAGATTAGAGGTAACGTA TTGGTGCTCTCACAACACAAATTTGCATCTAATGTGGTGAGAAAT GTGTTACTCATGCTTCTAGAACGGAAAGGGCAGTTCTCATAGACG AAGTTTGCACAATGAATGATGGTCCTCATAGCGCACTTTATACCAT GATGAAGGACCAGTATGCAAACTATGTCGTCCAGAAAATGATCGA TGTGGCGGAGCCCGGTCAACGGAAAATCGTGATGCACAAAATCCG

40

【表 E - 2】

	ACCTCACATTGCTACACTCAGAAAATACACGTATGGAAAACATAT TCTGGCTAAGCTGGAGAAATATTACATGAAGAATGGAGTGGATCT GGGG (配列番号452)
WPRE	Aatcaacctctggattacaaaatttggaaagattgactggfattcttaactatgttgcctctttacgctatgtggat acgctgctttaatgcccttltgatcatgctatltgcttcccgatggcttctcaatttctcctcttltgataaaccttggltgct gtctcttltatgaggagtttggcccggtgtcaggcaacgttggcggtgtgtcactgtgttctgtacgcaacccc cactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccggggacttctgttctccctccctattgccacggcg gaacatcgcgcgcctgtccttgcgcgtgtgtggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtt gtcggggaaatcatgtcttcttcttggctgtcgcctgtgttggccacttggattctgcgcggggacgtcttctgt tacgtcccttccggccctcaatccagcgggaccttcttcccgcggcctgtgtcgggctctgcggcccttccgcg tcttgccttgcgcctcagacgagtcggatccttcttggggcgccctccccc (配列番号607)
SV-40 ポリA	AACTTGTATTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCA TCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCTACTGCATTCTAGTTG TGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号533)
3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCCGACGCCCGGG CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCT GCAGG (配列番号600)

10

RNAを遮断の標的とする例示的な組成物

20

【 0 1 4 9 】

DMPKの非コード3'非翻訳領域におけるCTGマイクロサテライト伸長は、DM1を引き起こす。DMPK mRNAにおける伸長されたCUG (CUG^{exp}) リピートは、MBNLタンパク質を直接隔離し、それに起因してそれらの機能が喪失される。MBNL機能喪失は、DM1の際に認められる選択的スプライシング異常および臨床症状の直接的な原因となる。PUF (CUG) またはdCas13d (CUG) は、CUG^{exp} RNAに直接結合し、MBNL隔離を阻止して、ほぼ正常な遊離MBNLレベルおよび機能を保存することになり、これによって、DM1疾患表現型、例えば、スプライシング機能障害、筋強直などが回復することになる。以下のPUF (CUG) およびdCas13d (CUG) RNA標的化構築物は、遮断のための例示的な実施形態である。

30

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、本開示は、表 F に示されるような R B N L S と融合した C U G 標的化 P U F タンパク質を提供する。

表 F : C U G RNA を遮断するための例示的な C U G 標的化 8 P U F

【表 F】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKL ERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLE QKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMV RELDGHVCLKCVKDQNGSYVVEKCIQVQPSQLQFIIDAFKGG VFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPIEELHQHTEQLVQD QYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVVLVLSQHKFASN VEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYA NYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILA KLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)

40

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、遮断に好適なCUG標的化PUFタンパク質を含む本開示のAAVベクターは、5'から3'へ、表Gに示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAVベクターは、配列番号578または579で示される核酸配列を含む。

50

表 G : C U G を遮断の標的とする例示的な P U F

N 末端から C 末端への順序でのプラスミド要素のヌクレオチド配列

【表 G - 1】

プラスミド要素	アミノ酸配列
5' ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTTCCT (配列番号 599)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT TGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAaCCGGTGCCTAGA GAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCG TGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT TTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGaattccagGT AAGTCCCGCAGCCGTAACGACCTTGGGGGGGTGTGA GATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAA AGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGACACGCTTA TGTTTTACTTTTAACTAGGT (配列番号 609)
コザック	gccgccACCatg (配列番号 529)
Rb-NLS	Gaccgtgtgtcaaaagaagtgtgaagggaagcaacctcctaaccactgaaaaactacgc (配列番号 604)
リンカー	ggaGGATCG
8PUF	GGACGAAGCCGACTCTTGGAAGACTTCAGAAACAAT CGGTATCCGAACCTTCAGCTGAGAGAAATTGCTGGT CACATCATGGAATTTTCTCAAGATCAACATGGAAGC CGGTTTATTGAACTTAACTCGAACGAGCCACCCCG GCCGAAAGGCAATTGGTGTTCATGAAATTCTTCAG GCCGCATACCAACTCATGGTTGATGTTTTTGGGAACT ATGTTATTCAAAAGTTTTTTGAGTTCGGGTCCTGGA GCAAAAGTTGGCATTGGCAGAGCGAATCCGGGGCCA TGTTCTGAGCCTCGCTCTCCAAATGTACGGTAGTTAT GTCATTTCGCAAAGCACTCGAGTTCATACCATCAGATC AACAGAATGAGATGGTGCGGGAGCTGGATGGGCATG TTTTGAAATGCGTGAAAGACCAAAACGGTAGCTACG TAGTTGAGAAATGCATCGAATGCGTCCAACCACAGT

10

20

30

40

50

【表 G - 2】

	CTCTCCAATTTATTATAGATGCATTTAAGGGTCAGGT TTTCGCGCTTTCTACGCACCCGTATGGGAACCGAGTG ATTCAGAGAATCTTGGAGCACTGCCTGCCGGATCAG ACACTCCCTATCTTGGAGGAATTGCACCAGCATAACCG AACAATTGGTGCAAGATCAATACGGTTCATATGTTAT TCGGCACGTTCTTGAGCATGGAAGGCCAGAGGACAA GTCAAAGATCGTCGCTGAGATTAGAGGTAACGTATT GGTGCTCTCACAACACAAATTTGCATCTAATGTGGTG GAGAAATGTGTTACTCATGCTTCTAGAACGGAAAGG GCAGTTCTCATAGACGAAGTTTGCACAATGAATGAT GGTCCTCATAGCGCACTTTATACCATGATGAAGGACC AGTATGCAAACCTATGTCTGTCAGAAAATGATCGATG TGGCGGAGCCCGGTCAACGGAAAATCGTGATGCACA AAATCCGACCTCACATTGCTACACTCAGAAAATACA CGTATGGAAAACATATTCTGGCTAAGCTGGAGAAAT ATTACATGAAGAATGGAGTGGATCTGGGG (配列番号 452)	10
WPRE	Aatcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggattcttaactatgttgcctct ttacgctatgtggatacgtgctttaatgctttgtatcatgctattgcttcccgatgcttt cattttctctctgtataaactctggttctgtctctttatgaggagtgtggcccggtgtca ggcaacgtggcggtgtgtgactgtgttctgacgcaacccccactggttggggcatt ggcaccacctgtcagctctttccggacttcttccccctctattgccacggcgg aactcatgcgcctgcttcccgtgctgacaggggctcggtgttgggactga caattccgtggtgtgtcggggaaatcatgctcttcttggctgctcgctgtgttcca cctggattctgcggggacgtcttctgtacgtccttccgcccctcaatccagcggacc ttccttcccgcggtctgtcggtctgtcggtcttccggtcttctgcttctgcccctca gacgagtcggatctcccttgggcccctccccgc (配列番号 607)	20
SV-40 ポリA	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAA GCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTT TTCATGCAATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC AATGTATCTTA (配列番号 533)	30
3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA GGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列 番号 600)	40

エンドヌクレアーゼがない、myc タグを有する、CUG (DM1) を標的とする PUF
【0152】

一部の実施形態では、本開示は、表 H に示されるような RB-NLS と融合した CUG
標的化 PUF タンパク質を提供する。

表 H: CUG RNA を遮断するための例示的な CUG 標的化 8 PUF

【表 H - 1】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGS

10

20

30

40

50

【表 H - 2】

8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKL ERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLE QKLALAEIRIGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMV RELDGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKGG VFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQD QYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNV VEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYA NYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILA KLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)
リンカー	GGG
Myc タグ	EQKLISEEDL (配列番号 610)

10

【0153】

一部の実施形態では、遮断に好適な CUG 標的化 PUF タンパク質を含む本開示の AAV ベクターは、5' から 3' へ、表 I に示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAV ベクターは、配列番号 581 または 582 で示される核酸配列を含む。

表 I: CUG を遮断の標的とする PUF を含む例示的な AAV ベクター

【表 I - 1】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
5' ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCT CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC AACTCCATCACTAGGGGTTTCCT (配列番号 599)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT TGGGGGGAGGGGTCTGGCAATTGAaCCGGTGCCTAGA GAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCG TGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT TTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGaattccagGT AAGTCCCCGAGCCGTAACGACCTTGGGGGGGTGTGA GATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAA AGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGACACGCTTA TGTTTTACTTTTAACTAGGT (配列番号 609)
コザック	gccgccACCatg (配列番号 529)
Rb-NLS	Gaccgtgtgtctcaaaagaagtgtctgaagggaagcaacctctaaaccactgaaaaactacgc (配列番号 604)
リンカー	ggaGGATCG
8PUF	GGACGAAGCCGACTCTTGGAAGACTTCAGAAACAAT CGGTATCCGAACCTTCAGCTGAGAGAAATTGCTGGT CACATCATGGAATTTTCTCAAGATCAACATGGAAGC CGGTTTATTGAACTTAACTCGAACGAGCCACCCCG GCCGAAAGGCAATTGGTGTTCATGAAATTCCTCAG GCCGCATACCAACTCATGGTTGATGTTTTTGGGAACT ATGTTATTCAAAAGTTTTTTGAGTTCGGGTCACTGGA GCAAAAGTTGGCATTGGCAGAGCGAATCCGGGGCCA TGTTCTGAGCCTCGCTCTCAAATGTACGGTAGTTAT GTCATTTCGCAAAGCACTCGAGTTCATACCATCAGATC

20

30

40

【表 I - 2】

	AACAGAATGAGATGGTGCGGGAGCTGGATGGGCATG TTTTGAAATGCGTGAAAGACCAAAACGGTAGCTACG TAGTTGAGAAATGCATCGAATGCGTCCAACCACAGT CTCTCCAATTTATTATAGATGCATTTAAGGGTCAGGT TTTCGCGCTTTCTACGCACCCGTATGGGAACCGAGTG ATTCAGAGAATCTTGGAGCACTGCCTGCCGGATCAG ACACTCCCTATCTTGGAGGAATTGCACCAGCATACCG AACAATTGGTGCAAGATCAATACGGTTCATATGTTAT TCGGCACGTTCTTGAGCATGGAAGGCCAGAGGACAA GTCAAAGATCGTCGCTGAGATTAGAGGTAACGTATT GGTGCTCTCACAAACAAAATTTGCATCTAATGTGGTG GAGAAATGTGTTACTCATGCTTCTAGAACGGAAAGG GCAGTTCTCATAGACGAAGTTTGCACAATGAATGAT GGTCCTCATAGCGCACTTTATACCATGATGAAGGACC AGTATGCAAACTATGTCTGCCAGAAAATGATCGATG TGGCGGAGCCCGGTCAACGGAAAATCGTGATGCACA AAATCCGACCTCACATTGCTACACTCAGAAAATACA CGTATGGAAAACATATTCTGGCTAAGCTGGAGAAAT ATTACATGAAGAATGGAGTGGATCTGGGG (配列番号 452)	10
リンカー	GGCGGAAGT (配列番号 611)	20
Myc タグ	GAGCAAAAAGTGAAGAAGATCTC	
WPRE	Aatcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggattcttaactatgttgcctc tttacgctatgtggatagctgcttaatgacctttgtatcatgctattgcttccglatggctt catttctccctctgtataaactctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccggtgtca ggcaacgtggcggtgtgacactgtgtgtgctgacgcaacccccactgggtggggcatt gccaccacctgacgctcttccgggacatttgccttccccctccctattgccacggcgg aacctcatcgccgctgcttgcctgctgacaggggctcggtgttgggcaactga caattccgtgggtgtgtcggggaaatcatgctcttcccttggctgctcgctgtgttcca cctggattctgcgcgggacgctcttctgctacgtcccttccggccctcaatccagcggacc ttccttccccgcgctgctgctggccttgcggccttccgcgtcttgccttgccttca gacgagtcggatctcccttggggcgcctccccgc (配列番号 607)	30
SV-40 ポリA	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAA GCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTT TTCAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATC AATGTATCTTA (配列番号 533)	
3' ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA GGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号 600)	

A 0 1 5 6 0 : エンドヌクレアーゼのない、C U G を標的とする d C a s 1 3 d d S e q 2 1 2 (触媒ドメインに 4 つの点変異)

【0 1 5 4】

一部の実施形態では、本開示は、表 J に示されるような、4 つの点変異を有する、C U G を標的とする触媒として不活性な C a s (d C a s 1 3 d) を提供する。

表 J : C U G RNA を遮断するための例示的な C U G 標的化 d C a s 1 3 d

【表 J】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
dCas13d Seq212	KKKHQSAAEKRQVKLKNQEKAAQKYASEPSPLQSDTAGVECSQKKTVVS HIASSKTLAKAMGLKSTLVMGDKLVITSFAASKAVGGAGYKSANIEKITDL QGRVIEEHERMFSAADVGEKNIELSKNDCHTNVNNPVVTNIGKDYIGLKSR EQEFFGKTFENDNLHVQLAYNILDIKKILGTYVNNIIFYNLNRAGTGRDE RMYDDLIGTLTYAYKPMEAAQQTLLKGDKDMRRFEEVKQLLQNTSAYYVY YGTLEKVKAKSKKEQRAKEAEIDACTAHNYDVLRLLSLMAQLCMASVA GTAFKLAESALFNIEDVLSADLKEILDEAFSGAVNKLNDGFVQHSNNLYV LQQLYPNETTIERIAEKYYRLTVRKEDLNMGVNIKKLRELIVGQYFPEVLDK EYDLSKNGDSVVITYRSKIYTMNYILLYYLEDHDSRESMVEALRQNR DEGKEEYRQFAKKVWNGVSGLFGVCLNLFKTEKRNKFRSKVALPDVSGA AYMLSSENIDYFVKMLFFVCKFLDGKEINELLCALINKFDNIADILDAAAQC GSSVWFVDSYRFFERSRRISAQIRIVKNIAKDFKSKKSDSESYPEQLYLD ALALLGDVISKYQNRDGSVIDDQGNALVTEQYKRFRYEFEEIKRDESG GIKYKSGKPEYNHQRNFILNNVLKSKWFFYVVKYNRPSSCRELMKNKEI LRFVLRDIPDSQVRRYFKA VQGEAAYASAEAMRTRLVDALSQFSVTACLD EVGGMTDKEFASQRAVDSKEKLRAIIRLYLTVAYLITKSMVKVNTRFSIAFS VLERDYLLIDGKKKSSDYTGEDMLALTRKFVGEDAGLYREWKEKNAEA KDKYFDKAERKKVLRQNDKMIRKMHFTPHSLNYVQKNLESVQSNGLAAV IKEYANAVAALNIINRLDEYIGSARADSYSLYCYCLQMYLSKNFSVGYLI NVQKQLEEHTYMKDLMWLLNIPFAYNLARYKNLSNEKLFYDEEAAAAEK ADKAENERGE (配列番号583)
リカー	GS
SV-40 NLS	PKKKRKV (配列番号437)
リカー	GGG
Mycタグ	EQKLISEEDL (配列番号610)

10

20

【0155】

一部の実施形態では、CUG標的化dCas13dタンパク質を含む、A01560と呼ばれる、本開示のAAVベクターは、5'から3'へ、表Kに示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAVベクターは、配列番号584または585で示される核酸配列を含む。

表K： CUG標的化dCas13dを含む例示的なAAVベクターA01560

【表 K-1】

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgcctcgcctcactgaggccgccccggcgctggcgacatttgctgccccggcctcag tgagcgagcgagcgagcgagagagggagtgcccaactccatcactaggggttccct (配列番号599)
ヒト U6 プロモーター	Gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatalacgatacaagcgtttagagagataattggaatttaattgactgt aaacacaaagataattagtaaaaatcgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaa aatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttgcatttcttggcttataatcttgggaaaggacgaaacacc (配列番号519)
Seq212 ダイレクトリピート(DR)	Tagccctgcagtaaggcagggttetaagac (配列番号614)
スパーサー(CTGガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号459)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGG TCGGCAATTGAaCCGGTGCTTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAaACTGGG AAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGA ACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGG TTTGCCGCCAGAACACAGaattccagTAAGTCCCCGAGCCGTAACGACCTT GGGGGGGTGTGAGATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAA AGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGACACGCTTATGTTTTACTTTTA AACTAGGT (配列番号609)
コザック配列	GCCGCCACCATG (配列番号529)

30

40

【表 K - 2】

失活 Cas13d Seq212	AAGAAGAAGCACCAGAGCGCCGCCGAGAAGAGGCAAGTGAAGAAGCT CAAGAAATCAAGAGAAGGCCAGAAAGTACGCTAGCGAGCCTTCCCCCT CCAGAGCGATACAGCTGGCGTGGAAATGCTCCCAAGAAAAGACAGTCGT CAGCCACATTGCCAGCTCCAAGACACTGGCCAAGGCTATGGGACTCAA ATCCACACTGGTCATGGGCGACAAGCTGGTCATCACCAGCTTTGGCT AGCAAGGCTGTCCGAGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAA ATCACAGATCTGCAAGGAAGGGTCATTGAGGAGCACGAAAGGATGTTT AGCGCCGATGTCCGAGAGAAAAATATCGAACTGAGCAAGAATGACTGC CACACCAACGTCAACAAACCCCGTGGTGACCAACATCGGAAAGGATTAC ATCGGACTGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTCGGCAAGACATTCC AGAATGACAATCTGCATGTGCAGCTGGCTACAAATATCTCGACATCAA GAAAATTCTGGGAACCTATGTGAACAATATCATTATATCTTCTACAAT CTGAATAGGGCTGGCACCCGGCAGAGATGAGAGGATGTATGACGACCTC ATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGGCTCAACAGACCTATC TGCTCAAAAGGCGACAAAGGATATGAGGAGGTTTGGAGAGGTGAAACAGC TGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTCGA GAAGGTGAAGGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGCCG AAATCGACGCTTGTAACCGCCATAACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTC CCTCATG_{gc}GCAGCTGTGCATG_{gc}CTCCGTGCTGGAAACAGCCTTTAAGC TGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCCGATCT GAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAGCTCAAT GACGGATTCTGTGACGACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGCAGC TGTACCCCTAATGAGACCATCGAGAGAAATCGCCGAGAAGTACTACAGAC TCACCGTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGGGAGTCAACATTAAGAAAGC TGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCCCGACAAAGA ATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCA GATTTATACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCAC GACTCCAGCAGAGAAAGCATGGTCGAAGCTCTGAGACAAAACAGAGAG GGCGATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATAGACAGTTTGCCAAGAAGGTG TGGAACGGCGTGTCCGGAAGTGTGGCGTGTGCTGAACCTCTTCAAGA CCGAAAAGAGAAACAAGTTTAGGAGCAAGTCGCCCTCCCGATGTGT CCGGCGCTGCCTATATGCTCTCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAA GATGCTCTTCTTTGTGTGAAGTTTCTGGATGGCAAAGAAATCAACAG CTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGATAAATTATGCGATATTCTGG ATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCCTCCGTCTGGTTCGTGGACAGCTATAG GTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAG AACATCGCTTCCAAGGATTTTAAGAAATCCAAGAAGGATTCCGATGAG AGCTACCCCGAGCAGCTGTATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACG TCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGATGGCAGCGCTCGTATCGATG ACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTTTAGATATG AATTTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGGGCGGCATCAAGTACA AGAAGTCCGGAAAAACCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTC TGAATAATGTCTGAAAAGCAAAATGGTTTTCTATGTGGTGAAGTACAA TAGGCCCAAGCTGCAGAGAACTGATGAAGAATAAGGAAATTCAGAG GTTCTGTGCTGAGAGACATCCCGACTCCCAAGTGAGAAGATACTTTAAG GCCGTCCAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAGCTATGAGGACA AGACTGGTCTGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACAGCTTGTCTGGATG AAGTGGGCGGCATGACAGACAAGGAATTCGCTCCAGAGGGCCGTCG ATAGCAAAAGAAAACTGAGAGCCATCATCAGACTGTATCTGACAGTCG CCTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAAGGTTTAGCAT TGCCTTTAGCGTGCTGGAGAGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAG AAGAAATCCAGCGACTACACCGGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGA AAATTTGTGGGCGAAGATGCTGGACTGTATAGAGAGTGGAAAGAGAAAG AACGCTGAAGCCAAAGGACAAATATTTTGACAAGGCCGAAAGGAAGAA GTGCTGAGACAGAACGATAAGATGATCAGAAAAGATGCACTTCACACCC CACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAAATCTCGAAAGCGTCCAGAGCAACG GACTGGCCGCCGTCATCAAGGAATAT_{gc}AAATGCGCTCGCT_{gc}CCTCAAT ATCATCAATAGACTGGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCT ACTACTCTCTGTACTGTACTGCCTCCAAATGTATCTGAGCAAGAACTTC AGCGTGGGCTACCTCATCAACGTGCAAAAGCAGCTGGAGGAGCACAC ACCTACATGAAGGATCTCATGTGGCTGCTCAACATCCCTTCGCTTACA ACCTCGCCAGATACAAAAATCTGTCCAACGAAAAACTCTTTACGACGA GGAAGCCGCCGCCGAAAAAGGCTGACAAGGCTGAGAACGAGAGAGGCG AA (配列番号612)
リンカー	GGAAGC

10

20

30

40

【表 K - 3】

SV-40 NLS	CCCAAGAAGAAAAAGGAAGGTC (配列番号532)
リンカー	GGCGGAtct (配列番号613)
Myc タグ	GAGCAgAAACTGATTAGcGAAGAgGATCTC (配列番号602)
WPRES	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTC TTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCT TTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTGTAT AAATCCTGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCTGCCTTG CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGG (配列番号603)
SV-40 ポリA	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAAGCAATAGCATCA CAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCATTCTAGTTGTGGTTTG TCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号533)
3' ITR	Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgcctcactgagccggcgacccaaaggc gcccagaccccgggcttggccggggccctcaglgagcgagcgagcgagcagctgacctgagg (配列番号 600)

10

C a s 1 3 d : エンドヌクレアーゼのない、**C U G**を標的とする **d S e q 2 1 2** (**H E P N 2**に1つの点変異**H 9 1 9 A**を有する)

【0156】

一部の実施形態では、本開示は、表 L に示されるような **H E P N 2**に**H 9 1 9 A**変異を有する、**C U G**を標的とする触媒として不活性な **C a s (d C a s 1 3 d)**を提供する。

表 L : **C U G** RNAを遮断するための例示的な **C U G**標的化 **d c a s 1 3 d**

20

【表 L】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
失活 Seq212 H919A	KKKHQSAAEKRQVKLKNQEKAQKYASEPSPLQSDTAGVECSQKKTVVSHIASSKTLAKAMG LKSTLVMGDKLVITSFAASKAVGGAGYKSANIEKITDLQGRVIEEHERMFSAADVGEKNIELSKN DCHTNVNNPVVTNIGKDYIGLKSRLQEFGKTFENDNLHVQLAYNILDIKKILGTYVNNIYIF YNLNRAGTGRDERMYDDLIGTLAYAKPMEAQQTYLLKGDKDMRRFEEVKQLLQNTSAYYVY YGTLFEEKVAKSKKEQRAKEAIDACTAHNYDVLRLSLMRQLCMHSAVAGTAFKLAESALFN IEDVLSADLKEILDEAFSGAVNKLNDGFVQHSNNLYVLQQLYPNETIERIAEKYYRLTVRKED LNMGVNIKLRRELIVGQYFPEVLDEYDLSKNGDSVVYTYRSKIYTVMNYILLYLEDHDSRE SMVEALRQNRREGDEGKEEIYRQFAKKVWNGVSGLFGVCLNLFKTEKRNKFRSKVALPDVSGA AYMLSENIDYFVKMLFFVCKFLDGKEINELLCALINKFDNIADILDAQAQCGSSVWFVDYRF FERSRISAQIRIVKNIAKDFKSKKDSDESYPEQLYLDALALLGDVSKYKQNRDGSVIDDQ GNAVLTEQYKFRYEFEEIKRDESGGIKYSKSGKPEYNHQRNFILNNVLKSKWFFYVVKYN RPSSCRELMKNKEILRFVLRDIPDSQVRRYFKAQVQGEAYASAEAMRTRLVDALSQFSVTACL DEVGGMTDKFASQRAVDSKEKLRAIIRLYLTVAYLITKSMVKVNTRFSIAFSVLERDYLLID GKKKSSDYTGEDMLALTRKFVGEDAGLYREWKEKNAEAKDKYFDKAERKKVLRQNDKMIR KMHFTHPSLNYVQKNLESVQSNGLAAVKEYRNAVAALNINRLDEYIGSARADSYSLYCYC LQMYLSKNFSVGYLINVQKQLEEHHTYMKDLMWLLNIPFAYNLARYKNLSNEKLFYDEEAAA EKADKAENERGE (配列番号586)
リンカー	GS
SV-40 NLS	PKKKRKV (配列番号437)
リンカー	GGG
Myc タグ	EQKLISEEDL (配列番号610)

30

【0157】

40

一部の実施形態では、**C U G**標的化 **d C a s 1 3 d**タンパク質を含む本開示の **A A V**ベクターは、5'から3'へ、表 M に示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、**A A V**ベクターは、配列番号590または591で示される核酸配列を含む。

表 M : **C U G**標的化 **d C a s 1 3 d**を含む例示的な **A A V**ベクター

50

【表 M - 1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgagggcggccggcgctcggcgacaccttggcggccggcctcagtgagcgagcgagcgcgc agagaggagggggccaaacccatcactaggggctc (配列番号 599)
ヒト U6 プロモーター	Gagggcctatttcccatgattcctcatalitgcatatcagataaaggctgttagagagataatggaaatlaattgactgaaacacaaagatattagtac aaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctggtagtttgcagttttaaattatgttttaaatggactatcatatgctaccgtaactgaaagtattcga ttcttggctttatatacttgggaaaggacgaaacacc (配列番号 519)
Seq212 ダイレクト リピート(DR)	Tagccctgcagtaaggcagggttctaagac (配列番号 614)
スパーサー (CTG ガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAA CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCC GCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGACAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT TTTTCGCAACGGGTTTGGCCGAGAACACA GaattccagGTAAGTCCCGCAGCCGTAAACGACCT TGGGGGGGTGTGAGATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAAAGCAAGAAATA CAATGATCCTGAGGTGACACGCTTATGTTTTACTTTTAAACTAGGT (配列番号 609)
コザック配列	GCCGCCACCATG (配列番号 529)
dCas13dSeq212 H919A	AAGAAGAAGCACACAGAGCGCCGCGAGAGAAGAGGCAAGTGAAAGAAGCTCAAGAATCAAGA GAAGGCCCCAGAAAGTACGCTAGCGAGCCTTCCCCCTCCAGAGCGATACAGCTGGCGTGGA ATGCTCCAGAAAAAGACAGTCGTCAGCCACATTGCCAGCTCCAAGACACTGGCCAAAGGC TATGGGACTCAAATCCACACTGGTCAATGGGCGACAAGCTGGTCAATCACCAGCTTTGCTGCT AGCAAGGCTGTGCGAGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAAATCACAGATCTG CAAGGAAGGGTCAATTGAGGAGCACGAAAGGATGTTAGCGCCGATGTGCGAGAGAAAAA TATCGAAGTGAAGCAAGAAATGACTGCCACACCAACGTCACAAACCCCGTGGTGACCAACAT CGGAAAGGATTACATCGGACTGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTCGGCAAGACATT CGAGAATGACAATCTGCATGTGCAGCTGGCCTACAATATCCTCGACATCAAGAAAAATTCTG GGAACCTATGTGAACAATATCATTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCGGCA GAGATGAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAAACCCATGGAGG CTCAACAGACCTATCTGCTCAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGTGAAAC AGCTGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTTCGAGAAGGTGAA GGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGCCGAAATCGACGCTTGTACCGCCC ATAACTACGATGTGCTGAGACTGTCTCCCTCATGagGCAAGCTGTGCATGcaCTCCGTCGCTG GAACAGCCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCGA TCTGAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAGCTCAATGACGGATTCT GTGCAGCACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGCAGCTGTACCCTAATGAGACCATCG AGAGAATCGCCGAGAAAGTACTACAGACTACCGTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGGGA GTCAACATTAAAAAGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCCTCGAC AAAGAATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTTAT ACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCACGACTCCAGCAGAGAAAGCA TGGTCAAGGCTCTGAGACAAAAACAGAGAGGGCGATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATAGA CAGTTTGCCAAAGGTGTGGAACGGCGTGTCCGGACTGTTTGGCGTGTGTCTGAACCTCT TCAAGACCGAAAAAGAGAAACAAGTTTAGGAGCAAAAGTCGCCCTCCCGATGTGTCCGGCG CTGCCTATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAAGATGCTCTTCTTTGTGTGT AAGTTTCTGGATGGCAAAGAAATCAACGAGCTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGATA ATATTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCTCCGCTCTGGTTCTGTGGACAGC TATAGGTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAACATC GCTTCCAAGGATTTTAAAGAAATCCAAGAAGGATTCCGATGAGAGCTACCCCGAGCAGCTG TATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGATG GCAGCGTCGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTTTA GATATGAATTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGCGGCATCAAGTACAAGAAAGT CCGAAAAACCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGTGCTGAAAA GCAATAAGGAAATTTCTAGGTTCTGTGCTGAGAGACATCCCCGACTCCCAAGTGAGAAAGAT ACTTTAAGGCCGTCGAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAGCTATGAGGACAAGAC TGGTGCAGCCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACAGCTTGTCTGGATGAAGTGGGCGGCATGAC

10

20

30

40

50

【表 0-1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgtcgtcgtcactgagccgccggcgctgggcgacctttggtcgccggccctcagtgagcgagcgagcgccgagagaggaggagggccaactccactactaggggttcc (配列番号599)
ヒト U6 プロモーター	Gagggccatttcccatgattccctcatatttgcatalacgatacaaggcgtgtagagagataattggaattaatttgaactglaaacacaaagatattaglacaaaatacgtgacgtagaaaglaaataatttcttgaggtagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtlaacttgaagatatttgcatttcttggtttatatacttcttggaaaggacgaacacc (配列番号519)
Seq212 ダイレクト レポート(DR)	Tagccctgcagtaaggcaggggttctaagac (配列番号614)
スパーサー (CTG ガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号459)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAaCCGGTGCCTAGAGAAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTTCCCGAGGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCCGCGTGAACCGTTCTTTTTGCCAACCGGTTTGGCCGCCAGAACACAGaattccagGTAAGTCCCGCAGCCGTAACGACCTTGGGGGGGTGTGAGATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAAAGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGACACGCTTATGTTTTACTTTTAACTAGGT (配列番号609)
コザック配列	GCCGCCACCATG (配列番号529)
失活 Seq212 R914A	AAGAAGAACACCAAGAGCGCCGCCGAGAAGAGGCCAAGTGAAGAAGCTCAAGAATCAAGAGAAGGCCACAGAAGTACGCTAGCGAGCCTTCCCCCTCCAGAGCGGATACAGCTGGCGTGGAATGCTCCCGAGAAAAGACAGCTCGTCAGCCACATTGGCCAGCTCCCAAGGCTATGGGACTCAAATCCACACTGGTCAATGGGCGACAAAGCTGGTCAATCACCAGCTTTGCTGCTAGCAAGGCTGTCCGAGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAAATCAGAGATCTGCAAGGAAGGGTCAATTGAGGAGCACGAAAGGATGTTTAGCGCCGATGTCCGAGAGAAAAATATCGAAGCTGAGCAAGAATGACTGCCACACCAACGTCACAAACCCCGTGGTGACCAACATCGGAAGGATTACATCGGACTGAATCTTAGGCTGGAGCAAGATTTTCCGCAAGACATTGCGAAATGACAATCTGCATGTGCGAGCTGGCCTACAATCTCGACATCAAGAAAATTCTGGAAACCTATGTGAACAATATCATTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCGGCAAGATGAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGGCTCAACAGACCTATCTGCTCAAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGTGAAACAGCTGTCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTTCGAAAGGTGAAGGCTAAGACAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGCGGAAATCGACGCTTGTACCGCCATAACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTCCCTCATGagGCAGCTGTGCATGcaCTCCGTCGCTGGAACAGCCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCCGATCTGAAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAGCTCAATGACGGATTCTGTGAGCACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGAGCTGTACCCTAATGAGACCATCGAGAGAATCGCGGAGACTACAGACTACCGTGAAGGAGGATGAACATATGGAGTCAACATTAAAAAGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCTCGACAAAGAATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTTATACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCACGACTCCAGAGAGAAAAGCATGGTCTGAAGCTCTGAGACAAAACAGAGAGGGCGCATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATAGACAGTTTGCCAAAGAAGGTGTGGAACGGCGTCCGAGACTGTTTGGCGTGTGTCTGACACCTCTCAAGACCGCAAAAAGAGAAAAAAGTTTAGGAGCAAAAGTCGCCCTCCCGATGTGTCCGGCG

【表 0 - 2】

	CTGCCATATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAAGATGCTCTTCTTTGTGTGT AAGTTTCTGGATGGCAAAGAAATCAACGAGCTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGATA ATATTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCTCCGCTCTGGTTCTGGACAGC TATAGGTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAACATC GCTTCCAAGGATTTTAAAGAAATCCAAGAAGGATTCCGATGAGAGCTACCCCGAGCAGCTG TATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGATG GCAGCGTCTGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTTTA GATATGAATTTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGGCGGCATCAAGTACAAGAAGT CCGGA AAAACCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGTGCTGAAAA GCAATAGGTTTTCTATGTGGTGAAGTACAATAGGCCAGCAGCTGCAGAGAACTGATGA AGAATAAGGAATTTCTGAGGTTCTGTGCTGAGAGACATCCCCGACTCCCCAGTGAGAAAGAT ACTTTAAGGCCGTCCAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAGCTATGAGGACAAAGAC TGGTCTGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCAACAGCTTGTCTGGATGAAGTGGGCGGCATGAC AGACAAAGGAATTCGCCTCCAGAGGGCGCTCGATAGCAAAGAAAACTGAGAGCCATCAT CAGACTGTATCTGACAGTCCGCTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAAG GTTTAGCATTGCCTTTAGCGTGCTGGAGAGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAAGAA AAATCCAGCGACTACACCGGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGAAAATTTGTGGGCGAA GATGCTGGACTGTATAGAGAGTGGAAAAGAGAAAGAACGCTGAAGCCAAAGGACAAATATTTT GACAAAGGCCGAAAGGAAGAAGGTGCTGAGACAGAACGATAAGATGATCAGAAAAGATGCA CTTCACACCCCACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAATCTCGAAAGCGTCCAGAGCAACGGA CTGGCCGCGCTCATCAAGGAATATgcAAATGCCGTGCTCaCCTCAATATCATCAATAGACT GGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCTACTACTCTCTGTACTGTTACTGCCTC CAAATGTATCTGAGCAAGAAGCTTCAGCGTGGGCTACCTCATCAACGTGCAAAAGCAGCTG GAGGAGCACCACACCTACATGAAGGATCTCATGTGGCTGCTCAACATCCCCCTTCGCTTACA ACCTCGCCAGATACAAAAATCTGTCCAACGAAAACTCTTTTACGACGAGGAAGCCGCCG CCGAAAAGGCTGACAAGGCTGAGAACGAGAGAGGCGAA (配列番号616)
リンカー	GGAAGC
SV-40 NLS	CCCAAGAAAGAAAAGGAAGGTC (配列番号532)
リンカー	GGCGGAict (配列番号613)
Myc タグ	GAGCAgAAACTGATTAGcGAAGAgGATCTC (配列番号602)
WPRES	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAGATTGACTGGTATTCTTAATATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTA TGGCTTTCAITTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTAGTCTTGCCACGGCGGAAGCTCATC GCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGCTGG (配列番号603)
SV-40 ポリA	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAA ATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号533)
3'UTR	Aggaacccctagtgagtgaggctccctctctgctgctgctgctgctgagggcgagacccaaggctgcccagcccgagctt gcccggcgagctcagtgagcgagcgagcgagcgagctgagcagg (配列番号600)

10

20

30

C a s 1 3 d : エンドヌクレアーゼのない、**C U G**を標的とする **d S e q 2 1 2** (**H E P N 1**に1つの点変異 **R 2 9 3 A**を有する)

【0160】

一部の実施形態では、本開示は、表 P に示されるような、**H E P N 1**に **R 2 9 3 A**変異を有する、**C U G**を標的とする触媒として不活性な **C a s** (**d C a s 1 3 d**)を提供する。

表 P : **C U G** RNAを遮断するための例示的な **C U G**標的化 **d c a s 1 3 d**

40

50

【表 P】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
dCas13d Seq212 R293A	KKKHQSAAEKRQVKKLKNQEKAAQKYASEPSPLQSDTAGVECSQKKTVVSHIASSKTLAKAMG LKSTLVMGDKLVITTSFAASKAVGGAGYKSANIEKITDLQGRVIEEHERMFSADVGEKNIELSKN DCHTNVNNPVVTNIGKDYIGLKSRLSEQEFFGKTFENDNLHVQLAYNILDIKKILGTYYVNNIYIF YNLNRAGTGRDERMYDDLIGLTLYAYKPMEAQQTYLLKGDKDMRRFEFEVKQLLQNTSAAYYVY YGTLFEEKVAKSKKEQRAKEAEIDACTAHNYDVLRLSLMAQLCMHVSAGTAFKLAESALFN IEDVLSADLKEILDEAFSGAVNKLNDGFVQHSNNLYVLQQLYPNETIERIAEKYYRLTVRKED LNMGVNKKLRELIVGQYFPEVLDKEYDLSKNGDSVVITYRSKIYTVMNYYLLYYLEDHDSRE SMVEALRQNRREGDEGKEEYRQFAKKVWNGVSGLFQVCLNLFKTEKRNKFRSKVALPDVSGA AYMLSSENIDYFVKMLFFVCKFLDGKEINELLCALINKFDNIADILDAAAQCGSSVWFVDSYRF FERSRRISAIQIRIVKNIASKDFKKSKKDSDESYPEQLYLDALALLGDVISKYKQNRDGSVVIDDQ GNAVLTEQYKRFRYEFFEEIKRDESGGIKYKSGKPEYNHQRNRFILNNVLKSKWFFYVVKYN RPSSCRELMKNKEILRFVLRDIPDSQVRRYFKAQVQGEAYASAEAMRTRLVDALSQFSVTACL DEVGGMTDKEFASQRAVDSKEKLRAIIRLYLTVAYLITKSMVKVNTRFSIAFSVLERDYYLLID GKKKSSDYTGEDMLALTRKFVGEDAGLYREWKEKNAEAKDKYFDKAERKKVLRQNDKMIR KMHFTPHSLNYYQKNLESVQSNGLAAVIKEYRNAVAHLNIINRLDEYIGSARADSYSLCYC LQMYLSKNFSVGYLINVQKQLEEHHTYMKDLMWLLNIPFAYNLARYKNLSNEKLFYDEEAAA EKADKAENERGE (配列番号 588)
リカー	GS
SV-40 NLS	PKKKRKV (配列番号 437)
リカー	GGG
Myc タグ	EQKLISEEDL (配列番号 610)

10

【 0 1 6 1 】

20

一部の実施形態では、CUG標的化dCas13dタンパク質を含む本開示のAAVベクターは、5'から3'へ、表Qに示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAVベクターは、配列番号594または595で示される核酸配列を含む。

表 Q : C U G 標的化 d C a s 1 3 d を含む例示的な A A V ベクター

【表 Q - 1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgtcgtcgtcactgagggccgccggcgctcgggcgaccctttggtcgcccgccctcagtgagcgagcgagcgcgccagagaggaglgggccaactccalcactaggggtcct (配列番号 599)
ヒトU6 プロモーター	Gaggggcctatttcccatgatttccttcatatttgcataatcagatacagagcctgttagagagataattggaattaaatttgaactglaaacacaaagataattagtagc aaaafacgtgacgtagaaaagataaattcttctggtagtttgcagcttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaactgtgaagtagtttcga ttcttggctttatatacttcttggaaaggacgaacacc (配列番号 519)
Seq212 ダイレクト リピート(DR)	Tagccctgcaglaaggcaggggttctaagac (配列番号 614)
スパーサー (CTG ガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCTGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGGTCTGGCAATTGAa CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGTATGTCGTGTACTGGCTCC GCCTTTTCCCGAGGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT TTTTCGCAACGGGTTTTGCCGCCAGAAACAGaattccagGTAAGTCCCGCAGCCGTAACGACCT TGGGGGGGGTGTGAGATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAAAGCAAGAAATA CAATGATCCTGAGGTGACACGCTTATGTTTTACTTTTAAACTAGGT (配列番号 609)
コザック配列	GCCGCCACCATG (配列番号 529)
失活 Seq212 R293A	AAGAAGAAGCACCAAGAGCGCCCGCAGAGAAGAGGCAAGTGAAGAAGCTCAAGAATCAAGA GAAGGCCACAGAAGTACGCTAGCGAGCCTCCCCCTCCAGAGCGATACAGCTGGCGTGGGA ATGCTCCCAGAAAAAGACAGTCGTCAGCCACATTGCCAGCTCCAAGACACTGGCCAAAGGC TATGGGACTCAAATCCACACTGGTCATGGGCGACAAGCTGGTCAATCACCAGCTTTGCTGCT AGCAAGGCTGTCCGAGGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAAAATCACAGATCTG CAAGGAAGGGTCAATTGAGGAGCACGAAAAGGATGTTTAGCGCCGATGTGCGGAGAGAAAAA TATCGAACTGAGCAAGAATGACTGCCACACCAAGCTTCAACAAACCCCGTGGTGACCAACAT CGGAAAGGATTACATCGGACTGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTTCGGCAAGACATT CGAGAATGACAATCTGCATGTGCAGCTGGCCTACAATATCCTCGACATCAAGAAAATTCTG GGAACCTATGTGAACAATATCATTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCCGGCA GAGATGAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGG CTCAACAGACCTATCTGCTCAAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGTTGAAAC

30

40

【表 Q - 2】

	AGCTGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTGAGAAGGTGAA GGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGGCCGAAATCGACGCTTGTACCGCCC ATAACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTCCCTCATGgcGcAGCTGTGCATGcaCTCCGTCGCTG GAACAGCCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCCGA TCTGAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAAGCTCAATGACGGATTCT GTGCAGCACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGCAGCTGTACCCTAATGAGACCATCG AGAGAATCGCCGAGAAGTACTACAGACTACCGTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGGGA GTCAACATTAAGAAAGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCTCTGAC AAAGAATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTAT ACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCACGACTCCAGCAGAGAAAGCA TGGTCGAAGCTCTGAGACAAAACAGAGAGGGCGATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATAGA CAGTTTGCCAAAGAAGGTGTGGAACGGCGTGTCCGGACTGTTTGCGGTGTGTCTGAACCTCT TCAAGACCGAAGAAAGAGAAAACAAGTTTAGGAGCAAAAGTCCGCTCCCGGATGTGTCCGGCG CTGCCTATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAAGATGCTCTTCTTTGTGTGT AAGTTTCTGGATGGCAAAAGAAATCAACGAGCTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGATA ATATTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCTCCGCTCTGGTTCGTGGACAGC TATAGGTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAACATC GCTTCCAAGGATTTTAAAGAAATCCAAGAGGATTCCGATGAGAGCTACCCCGAGCAGCTG TATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGATG GCAGCGTCGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTTTA GATATGAATTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGCGGCATCAAGTACAAGAAAGT CCGGAAGAACCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGTGTGAAAA GCAATGGTTTTTCTATGTGGTGAAGTACAATAGGCCAGCAGCTGCAGAGAACTGATGA AGAATAAGGAAATTTCTGAGGTTCTGCTGAGAGACATCCCGACTCCCAAGTGAGAAGAT ACTTTAAGGCCGTCCAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAAGCTATGAGGACAAGAC TGGTCGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACAGCTTGTCTGGATGAAGTGGGCGGCATGAC AGACAAGGAATTCGCTCCAGAGGGCCGTCGATAGCAAGAAAACTGAGAGCCATCAT CAGACTGTATCTGACAGTCGCCTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAAG GTTTAGCATTGCCCTTAGCGTGCTGGAGAGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAGAAG AAATCCAGCGACTACACCGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGAAAAATTTGTGGGCGAA GATGCTGGACTGTATAGAGAGTGGAAAGAGAAGAACGCTGAAGCCAAGGACAAATATTTT GACAAAGGCCGAAAGGAAGAAGGTGCTGAGACAGAACGATAAGATGATCAGAAAAGATGCA CTTCACACCCCACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAATCTCGAAAGCGTCCAGAGCAACGGA CTGGCCGCGCTCATCAAGGAATATagAAATGCCGTGCTcaCTCAATATCATCAATAGACT GGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCTACTACTCTCTGTACTGTTACTGCCTC CAAAATGTATCTGAGCAAGAACTTCAGCGTGGGCTACCTCATCAACGTGCAAAAAGCAGCTG GAGGAGCACCACACCTACATGAAGGATCTCATGTGGCTGCTCAACATCCCCCTCGCTTACA ACCTCGCCAGATACAAAAATCTGTCCAAACGAAAAAATCTTTTACGACGAGGAAGCCGCCG CCGAAAAGGCTGACAAGGCTGAGAACGAGAGAGGCGAA (配列番号617)
リンカー	GGAAGC
SV-40 NLS	CCCAAGAAGAAAAGGAAGGTC (配列番号532)
リンカー	GGCGGAGct (配列番号613)
Myo タグ	GAGCAGAAAAGCTGATTAGcGAAGAgGATCTC (配列番号602)
WPRES	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTCCCGTA TGGCTTTCATTTCTCCTCTGTATATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACCTCATC GCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGCTGG (配列番号603)
SV-40 ポリA	AACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA ATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号533)
3'TTR	Aggaacccctagtaggagtaggccactccctctctgcccgcctgctgctcactgagccggggcgaccaaaggtagcccgacccgggctt gccccggcgccctcagtaggagtaggcgagcgcgcagctgctgaggg (配列番号600)

Cas13d: エンドヌクレアーゼのない、CUGを標的とするdSeq212 (HEPN1に1つの点変異H298Aを有する)

【0162】

一部の実施形態では、本開示は、表Rに示されるような、HEPN1にH298A変異を有する、CUGを標的とする触媒として不活性なCas (dCas13d)を提供する。

表R: CUG RNAを遮断するための例示的なCUG標的化dCas13d

10

20

30

40

50

【表 R】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
dCas13d Seq212 H298A	KKKHQSAAEKRVKLLKNQEKAQKYASEPSPLQSDTAGVECSQKKTVVSHIASSKTLAKAMG LKSTLVMGDKLVITSFAASKAVGGAGYKSANIEKITDLQGRVIEEHERMFSAADVGEKNIELSKN DCHTNVNNPVVTNIGKDYIGLKSRLQEFGKTFENDNLHVQLAYNILDIKKILGTYVNNIYIF YNLNRAGTGDRDERMYDDLIGTLAYYKPMEAQQTYLLKGDKDMRRFEEVKQLLQNTSAYYVY YGTLFEEKVAKSKKEQRAKEAIDACTAHNYDVLRLSLMRQLCMASVAGTAFKLAESALFN IEDVLSADLKEILDEAFSGAVNKLNDGFGVQHSNNLYVLQQLYPNETIERIAEKYYRLTVRKED LNMGVNIKKLRELIVGQYFPEVLDKEYDLSKNGDSVVTYRSKIYTMVNYILLYYLEDHDSRE SMVEALRQNRREGDEGKEEIYRQFAKKVWNGVSGLFGVCLNLFKTEKRNKFRSKVALPDVSGA AYMLSENIDYFVKMLFFVCKFLDGKEINELLCALINKFDNIADILDAQAQCGSSVWFVDSYRF FERSRISAIQIRIVKNIAASKDFKKSKKDSDESYPEQLYLDALALLGDVISKYKQNRDGSVVIDDQ GNAVLTEQYKFRYEFFEIEIKRDESGGIKYSKSGKPEYNHQRNFILNNVLKSKWFFYVVKYN RPSSCRELMKNKEILRFVLRDIPDSQVRRYFKAQVQGEAAYASAEAMRTRLVDALSQFSVTACL DEVGGMTDKFASQRAVDSKEKLRAIIRLYLTVAYLITKSMVKVNTFRSIAFSVLERDYLLID GKKKSSDYTGEDMLALTRKFVGEDAGLYREWKEKNAEAKDKYFDKAERKKVLRQNDKMIR KMHTPHSLNYVQKNLESVQSNGLAAVKEIYRNAVAHLNIIINRLDEYIGSARADSYYSLYCYC LQMYLSKNFVSVGYLINVQKQLEEHHTYMKDLMWLLNIPFAYNLARYKNLSNEKLFYDEEAAA EKADKAENERGE (配列番号589)
リナー	GS
SV-40 NLS	PKKKRKV (配列番号437)
リナー	GGG
Myc ポリ	EQKLISEEDL (配列番号610)

10

【0163】

20

一部の実施形態では、CUG 標的化 dCas13d タンパク質を含む本開示の AAV ベクターは、5' から 3' へ、表 S に示されるようなエレメントを含む。一部の態様では、AAV ベクターは、配列番号 596 または 597 で示される核酸配列を含む。

表 S: CUG 標的化 dCas13d を含む例示的な AAV ベクター

【表 S-1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
5' ITR	Cctgcaggcagctgcgcgctcgcctcactgagggccgccggcgctcggggcgaccttggcgcgccggcctcagtgagcgagcgagcgcgcc agagaggagtgcccaactccatcactaggggtct (配列番号599)
ヒトU6 プロモーター	Gagggcctattcccatgattcctcatalttgcataacgataaaggcgttagagagataattggaattaatggactgaaacacaaagatattagtag aaaatacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagtttcagttttaaattatgttttaaatggactatcatalgcttaccgtaacttgaaagatttcga ttcttggctttatatacttcttggaaggacgaaacacc (配列番号519)
Seq212 ダイレクト リピート(DR)	Tagccctgcagtaaggcagggttctaagac (配列番号614)
スペーサー(CTG ガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号459)
EFS/UBB プロモーター	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAa CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCC GCCTTTTTTCCCAGGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAGTAGTCGCCGTGAACGTTCT

30

40

50

【表 S - 2】

	TTTTCGCAACGGGTTTGCCTCCAGAACACAGaattccagGTAAAGTCCCGCAGCCGTAACGACCT TGGGGGGGTGTGAGATTCTCATTCTAATTTTGAAGAATATTAGGTGTAAAAGCAAGAAATA CAATGATCCTGAGGTGACACGCTTATGTTTTACTTTTAACTAGGT (配列番号 609)
コザック配列	GCCGCCACCATTG (配列番号 529)
失活 Seq212 H298A	AAGAAGAAAGCACCAGAGCGCCGCCGAGAAGAGGCAGTGAAGAAGCTCAAGAATCAAGA GAAGGCCCAAGTACGCTAGCGAGCCTTCCCCCTCCAGAGCGATACAGCTGGCGTGGG ATGCTCCCAAGAAAAGACAGTCGTCAGCCACATTGCCAGCTCCAAGACACTGGCCAAAGGC TATGGGACTCAAAATCCACACTGGTTCATGGGCGACAAGCTGGTTCATCACCAGCTTTGCTGCT AGCAAGGCTGTGCGAGGCGCTGGCTACAAAAGCGCTAACATTGAAAAAATCACAGATCTG CAAGGAAGGGTCATTGAGGAGCACGAAAAGGATGTTTAGCGCCGATGTCGGAGAGAAAA TATCGAACTGAGCAAGAATGACTGCCACACCAACGTCACCAACCCCGTGGTGACCAACAT CGGAAAAGGATTACATCGGACTGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTCGGCAAGACATT CGAGAATGACAATCTGCATGTGCAGCTGGCCTACAATATCCTCGACATCAAGAAAAATCTG GGAACCTATGTGAACAATATCATTTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCAGGCA GAGATGAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGG CTCAACAGACCTATCTGCTCAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGTGAAAC AGCTGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTGAGAAAGGTGAA GGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGCCGAAATCGACGCTTGTAACGCC ATACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTCCCTCATGagGCAGCTGTGCATGgcTCCGTCGCT GGAACAGCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTTCAACATTGAGGATGTGCTCAGCCCG ATCTGAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCTCCGGCGCCGTGAACAAGCTCAATGACGGATT CGTGACGACTCCGGCAACAATCTGTACGTGCTCCAGCAGCTGTACCTTAATGAGACCATC GAGAGAAATCGCCGAGAAGTACTACAGACTACCGTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGGG AGTCAACATTAAGGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCTCTCGA CAAAGAAATACGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTTA TACCGTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACACGACTCCAGCAGAGAAAGC ATGGTCTGAAGCTCTGAGACAAAACAGAGAGGGCGATGAAGGCAAGGAGGAGATCTATAG ACAGTTTGCCAAAGAGGTGTGAACGGCGTGTCCGACTGTTTGGCGTGTGCTGAACCTC TTCAAGACCGAAAAGAGAAAACAGTTTAGGAGCAAAAGTCCGCCCTCCCGATGTGTCCGGC TCTGCCTATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGTCAAGATGCTCTTCTTTGTGTG TAAGTTTCTGGATGGCAAGAAAATCAACGAGCTGCTGTGCGCTCTGATCAACAAAATTTGAT AATATTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCTCAATGTGGCTCCTCCGTCTGGTTCGTGGA GCTATAGGTTCTTCGAGAGATCTAGGAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAAACA TCGTCTTCAAGGATTTTAAGAAATCCAAGAAGGATTCCGATGAGAGCTACCCCGAGCAGC TGTATCTGGATGCTCTGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAAATAGAGA TGGCAGCGTCTGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTT TAGATATGAATTTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAAGCGCGGCATCAAGTACAAAGAA GTCCGGAACCCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGTGCTGAA AAGCAATAGGTTTTCTATGTGGTGAAGTACAATAGGCCACGAGCTGCAGAGAACTGAT GAAGAAATAAGGAAATTTCTGAGGTTCGTGCTGAGAGACATCCCGACTCCCAAGTGAGAAG ATACTTTAAGGCCGTCCAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAGCGCCGAAGCTATGAGGACAAG ACTGGTCGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACAGCTTGTCTGGATGAAGTGGCGGCATG ACAGACAAGGAATTCGCTCCAGAGGGCCGTCGATAGCAAAAGAAAACTGAGAGCCATC ATCAGACTGTATCTGACAGTCGCCTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAA GGTTTAGCATTTGCCTTTAGCGTGCTGGAGAGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAGAA GAAATCCAGCGACTACACCGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGAAAAATTTGTGGCGCA AGATGCTGGACTGTATAGAGAGTGGAAGAGAAAGACGCTGAAGCCAAAGGACAAATATTT TGACAAAGGCCGAAAAGGAAGAGGTGCTGAGACAGAACGATAAGATGATCAGAAAAGATGC ACTTCACACCCCACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAAATCTCGAAAGCGTCCAGAGCAACGG ACTGGCCGCCGTCATCAAGGAATATagAAATGCCGTGCTCcaCCTCAATATCATCAATAGAC TGGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCTACTACTCTCTGTAATGTTACTGCCTC CAAATGTATCTGAGCAAGAACTTCAGCGTGGGCTACCTCATCAACGTGCAAAAAGCAGCTG GAGGAGCACCACCTACATGAAGGATCTCATGTGGCTGCTCAACATCCCTTCGCTTACA ACCTCGCCAGATACAAAAATCTGTCCAAACGAAAAACTCTTTTACGACGAGGAAGCCGCCG CCGAAAAGGCTGACAAGGCTGAGAACGAGAGAGGCGAA (配列番号 618)
リンカー	GGAAGC
SV-40 NLS	CCCAAGAAAGAAAAGGAAGGTC (配列番号 532)
リンカー	GGCGGAtct
Myo タグ	GAGCAgAAACTGATTAGcGAAGAgGATCTC (配列番号 602)
WPRES	GATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTCCCGTA TGGCTTTTCAATTTCTCCTCTGTATAAATCTGGTTAGTTCTTGGCCACGGCGGAACCTATC GCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAAATCCGTGG (配列番号 603)

【表 S - 3】

SV-40 ポリA	AACTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA ATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号 533)
3' ITR	Aggaaccctagtgatggagtggccactccctctctgcgcgtcgtcgtcactgagggcgagaccgaaggtcggccgacggcggttt ggccggcgccctcagtgagcagcagcgcgcgcagctgcctcagg (配列番号 600)

RNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質のためのガイドRNA

【0164】

ガイドRNA (gRNA) という用語と単一ガイドRNA (sgRNA) という用語は

10

20

30

40

50

、本開示全体を通して互換的に使用される。

【0165】

本開示のガイドRNA (gRNA) は、スパーサー配列および「ダイレクトリピート」(DR) 配列で構成され得る。一部の実施形態では、ガイドRNAは、連続したスパーサー配列およびDR配列を含む、単一ガイドRNA (sgRNA) である。一部の実施形態では、スパーサー配列とDR配列は連続していない。一部の実施形態では、gRNAは、DR配列を含む。DR配列は、スパーサー配列が散在する、CRISPR遺伝子座(細菌ゲノムまたはプラスミドに天然に存在する)内の反復配列を指す。関連するCRISPR遺伝子座の配列が分かっている場合には、対応する(または同族の)Casタンパク質のDR配列を推測することができることは周知である。一部の実施形態では、ガイドRNAは、ダイレクトリピート(DR)配列およびスパーサー配列を含む。一部の実施形態では、本開示のガイドRNAまたは単一ガイドRNAをコードする配列は、リンカー配列によって分離されているスパーサー配列とDR配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、リンカー配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個またはその間の任意の数のヌクレオチド(nt)を含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態では、リンカー配列は、少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個またはその間の任意の数のヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、DR配列は、Cas13d DR配列である。

10

20

【0166】

一実施形態では、Cas13d媒介様式で1つまたは複数の標的RNA分子とハイブリダイズするgRNAは、1つまたは複数のダイレクトリピート(DR)配列、1つまたは複数のスパーサー配列、例えば、DR-スパーサー-DR-スパーサーのアレイを含む1つまたは複数の配列などを含む。一実施形態では、各gRNAが異なり得る、例えば、異なるRNA、または単一のRNAからの複数の標的領域、またはこれらの組合せを標的とし得る、複数のgRNAが、単一のアレイから生成される。一部の実施形態では、単離されたgRNAは、1つまたは複数のダイレクトリピート配列、例えば、プロセッシングされていない(例えば、約36nt)またはプロセッシングされたDR(例えば、約30nt)を含む。一部の実施形態では、gRNAは、標的RNAに対して特異的な1つまたは複数のスパーサー配列をさらに含み得る(例えば、標的RNAと相補的である)。ある特定のそのような実施形態では、複数のpolIIIプロモーターを使用して、複数のgRNA、スパーサーおよび/またはDRを駆動することができる。一実施形態では、ガイドアレイは、DR(約36nt)-スパーサー(約30nt)-DR(約36nt)-スパーサー(約30nt)を含む。

30

【0167】

本開示のガイドRNA (gRNA) は、天然に存在しないヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、本開示のガイドRNA、またはガイドRNAをコードする配列は、改変または合成されたRNAヌクレオチドを含むまたはそれからなる。例示的な改変されたRNAヌクレオチドとしては、これだけに限定されないが、プソイドウリジン(Ψ)、ジヒドロウリジン(D)、イノシン(I)、および7-メチルグアノシン(m7G)、ヒポキサンチン、キサンチン、キサントシン、7-メチルグアニン、5、6-ジヒドロウラシル、5-メチルシトシン、5-メチルシチジン、5-ヒドロキシメチルシトシン(hydropoxymethylcytosine)、イソグアニン、およびイソシトシンが挙げられる。

40

【0168】

本開示のガイドRNA (gRNA) は、標的配列内の改変されたRNAに結合し得る。本開示のガイドRNA (gRNA) は、標的配列内の改変されたまたは変異型(例えば、病原性)RNAに結合し得る。例示的なエピジェネティックにまたは転写後に改変されたRNAとしては、これだけに限定されないが、2'-O-メチル化(2'-OMe) (2

50

’-O-メチル化がリボース部分の遊離の2’-OHの酸素に存在する)、N6-メチルアデノシン(m6A)、および5-メチルシトシン(m5C)が挙げられる。

【0169】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のガイドRNAは、非コードC/Dボックス核小体低分子RNA(snoRNA)配列をコードする少なくとも1つの配列を含む。一部の実施形態では、snoRNA配列は、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列を含み、ここで、RNA分子の標的配列は、少なくとも1つの2’-OMeを含む。一部の実施形態では、snoRNA配列は、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列を含み、ここで、標的RNAと相補的である少なくとも1つの配列は、ボックスCモチーフ(RUGAUGA)(配列番号523)およびボックスDモチーフ(CUGA)(配列番号524)を含む。

10

【0170】

本開示のスペーサー配列は、RNA分子の標的配列に結合する。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、病原性標的RNAに結合する。

【0171】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、標的RNA配列に特異的に結合するスペーサー配列をさらに含む。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、87%、90%、95%、97%、99%、またはその間の任意のパーセンテージ相補性を有する。一部の実施形態では、スペーサー配列は、標的RNA配列に対して100%の相補性を有する。一部の実施形態では、スペーサー配列は、20個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、21個のヌクレオチド、22個のヌクレオチド、23個のヌクレオチド、24個のヌクレオチド、25個のヌクレオチド、26個のヌクレオチド、27個のヌクレオチド、28個のヌクレオチド、または29個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、26個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、スペーサー配列は、プロセッシングされておらず、30個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、プロセッシングされていないスペーサー配列は、30~36個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。

20

【0172】

本開示のDR配列は、本開示のCasポリペプチドに結合する。gRNAのスペーサー配列が標的RNA配列に結合すると、gRNAのDR配列に結合しているCasタンパク質は、標的RNA配列に配置される。その同族Casタンパク質またはその核酸に対して十分な相補性を有するDR配列は、Casタンパク質の標的核酸配列に選択的に結合し、その配列に対して少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはその間の任意のパーセンテージ同一性を有する。一部の実施形態では、十分な相補性を有する配列は、100%の同一性を有する。一部の実施形態では、本開示のDR配列は、二次構造または三次構造を含む。例示的な二次構造としては、これだけに限定されないが、ヘリックス、ステムループ、バルジ、テトラループおよびシュードノットが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、A形態のヘリックス、B形態のヘリックス、およびZ形態のヘリックスが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、ねじれたまたはらせん状になったステムループが挙げられる。例示的な三次構造としては、これだけに限定されないが、ねじれたまたはらせん状になったシュードノットが挙げられる。一部の実施形態では、本開示のDR配列は、少なくとも1つの二次構造または少なくとも1つの三次構造を含む。一部の実施形態では、本開示のDR配列は、1つもしくは複数の二次構造または1つもしくは複数の三次構造を含む。

30

40

【0173】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、本開示のRNA分子内のテトラループモチーフに選択的に結合する。一部の実施形態では、RNA分子

50

の標的配列は、テトラループモチーフを含む。一部の実施形態では、テトラループモチーフは、G A A A、G U G A、G C A AまたはG A G Aである配列の1つまたは複数を含むまたはそれからなる「G R N A」モチーフである。

【0174】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列に結合するガイドRNAまたはその一部は、RNA分子の標的配列とハイブリダイズする。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に結合するガイドRNAまたはその一部は、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に共有結合により結合する。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に結合するガイドRNAまたはその一部は、第1のRNA結合性タンパク質または第2のRNA結合性タンパク質に非共有結合により結合する。

10

【0175】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、終点を含めて、10個から100個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、終点を含めて、10個から30個の間のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個または30個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、20個のヌクレオチドを含むまたはそれらからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、21個のヌクレオチドを含むまたはそれらからなる。一部の実施形態では、本開示のスペーサー配列は、26個のヌクレオチドを含むまたはそれらからなる。

20

【0176】

ガイド分子は、一般に、種々のプロセシング状態で存在する。一例では、プロセシングされていないガイドRNAは、36 ntのDRであり、これに30~32 ntのスペーサーが続く。ガイドRNAは、Cas13d自体または他のRNaseによって、より短い「成熟」形態へとプロセシング（短縮化／改変）される。一部の実施形態では、プロセシングされていないガイド配列は、長さ約または少なくとも約30、35、40、45、50、55、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、またはそれを超えるヌクレオチド（nt）である。一部の実施形態では、プロセシングされたガイド配列は、約44~60 nt（例えば、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、または70 nt）である。一部の実施形態では、プロセシングされていないスペーサーは、約28~32 nt長（例えば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35 nt）であるが、成熟（プロセシングされた）スペーサーは、約10~30 nt、10~25 nt、14~25 nt、20~22 nt、または14~30 nt（例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35 nt）であり得る。一部の実施形態では、プロセシングされていないDRは、約36 nt（例えば、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、または41 nt）であるが、プロセシングされたDRは、約30 nt（例えば、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、または35 nt）である。一部の実施形態では、DR配列は、例えば5'末端で、1~10ヌクレオチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、~10ヌクレオチド）短縮化されて、成熟した予めプロセシングされたガイドRNAとして発現される。

30

40

【0177】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、核局在化配列（NLS）を含まない。

50

【0178】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、プロトスペーサーランキング配列（PFS）と相補的な配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部がPFSと相補的な配列を含むものを含め、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas13タンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含み得る。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部がPFSと相補的な配列を含むものを含め、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas13タンパク質またはそのRNA結合性部分をコードする配列を含み得る。一部の実施形態では、ガイドRNAまたはその一部は、PFSと相補的な配列を含まない。

【0179】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のガイドRNA配列は、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含む。一部の実施形態では、本開示のガイドRNA配列を含むベクターは、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含む。一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーターは、構成的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、誘導性プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列（the promoter is a sequence）は、組織特異的かつ／または細胞型特異的プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ハイブリッドまたは組換えプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAを哺乳動物細胞において発現させることができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAをヒト細胞において発現させることができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ガイドRNAを発現させ、ガイドRNAを細胞の核に制限することができるプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトRNAポリメラーゼプロモーターまたはヒトRNAポリメラーゼプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、U6プロモーターまたはU6プロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、U6プロモーターは、ヒトU6プロモーターである。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトtRNAプロモーターまたはヒトtRNAプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、ヒトバリンtRNAプロモーターまたはヒトバリンtRNAプロモーターをコードする配列から単離されたもしくはそれに由来する配列である。

【0180】

本開示の組成物の一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーターは、調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列を含むベクターは、調節エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、調節エレメントは、ガイドRNAの発現を増強するものである。例示的な調節エレメントとしては、これだけに限定されないが、エンハンサーエレメント、イントロン、エクソン、またはこれらの組合せが挙げられる。本開示の組成物の一部の実施形態では、本開示のベクターは、ガイドRNAをコードする配列、ガイドRNAの発現を駆動するためのプロモーター配列および調節エレメントをコードする配列のうちの1つまたは複数を含む。本開示の組成物の一部の実施形態では、ベクターは、本開示の融合タンパク質をコードする配列をさらに含む。

RNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質

【0181】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAは、標的RNA分子、およびRNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質に対応する。一部の実施形態では、gRNAは、RNAによりガイドされるRNA結合性融合タンパク質に対応し、この融合タンパク質は、第1および第2のRNA結合性タンパク質を含む。一部の実施形態では、融合タンパク質中の第1のRNA結合性タンパク質は、不活性化RNA結合性タンパク質、例えば、不活性化Casまたは触媒的に失活しているCasタンパク質である。一部の実施形態で

は、RNA結合性融合タンパク質をコードする配列に沿って、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、第2のRNA結合性タンパク質をコードする配列に対して5'側に位置する。一部の実施形態では、融合タンパク質をコードする配列に沿って、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、第2のRNA結合性タンパク質をコードする配列に対して3'側に位置する。

【0182】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合することができるタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に選択的に結合することができ、DNA分子には結合しない、哺乳動物DNA分子には結合しない、またはいかなるDNA分子にも結合しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊(break)を誘導することができるタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊を誘導することができ、DNA分子には結合しない、哺乳動物DNA分子には結合しない、またはいかなるDNA分子にも結合しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNA分子に結合し、RNA分子の破壊を誘導することができ、DNA分子には結合せず、その破壊も誘導しない、哺乳動物DNA分子には結合せず、その破壊も誘導しない、または、いかなるDNA分子にも結合せず、その破壊も誘導しないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

【0183】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質をコードする配列は、DNAヌクレアーゼ活性を有さないタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

【0184】

本開示の組成物の一部の実施形態では、本明細書に開示されるRNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質をコードする配列は、CRISPR Casタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、CRISPR Casタンパク質は、II型CRISPR Casタンパク質ではない。一部の実施形態では、CRISPR Casタンパク質は、Cas9タンパク質ではない。

【0185】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質をコードする配列は、VI型CRISPR Casタンパク質またはその一部を含む。一部の実施形態では、VI型CRISPR Casタンパク質は、Cas13タンパク質またはその一部を含む。本開示の例示的なCas13タンパク質は、これだけに限定されないが、細菌または古細菌を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCas13タンパク質は、これだけに限定されないが、*Leptotrichia wadei*、*Listeria seeligeri* serovar 1/2b (strain ATCC 35967/DSM 20751/CIP 100100/SLCC 3954)、*Lachnospiraceae bacterium*、*Clostridium aminophilum* DSM 10710、*Carnobacterium gallinarum* DSM 4847、*Paludibacter propionigenes* WB4、*Listeria weihenstephanensis* FSL R9-0317、*Listeria weihenstephanensis* FSL R9-0317、*bacterium* FSL M6-0635 (*Listeria newyorkensis*)、*Leptotrichia wadei* F0279、*Rhodobacter capsulatus* SB 1003、*Rhodobacter capsulatus* R121、*Rhodobact*

er capsulatus DE442および*Corynebacterium ulcerans*を含めた、任意の種から単離し得るまたはそれに由来し得る。本開示の例示的なCas13タンパク質は、DNAヌクレアーゼが不活化されたものであり得る。本開示の例示的なCas13タンパク質としては、これだけに限定されないが、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13dおよびそれらのオルソログが挙げられる。本開示の例示的なCas13bタンパク質としては、これだけに限定されないが、本明細書ではそれぞれCsx27およびCsx28と称される亜型1および2が挙げられる。

【0186】

例示的なCas13aタンパク質としては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる：

【表77-1】

Cas13a 番号	Cas13a 略語	生物体名	受託番号	ダイレクトリポート配列
Cas13a1	LshCas13a	<i>Leptotrichia shahii</i>	WP_018451595.1	CCACCCCAATATCGAAGGGGACTAA AAC (配列番号 393)
Cas13a2	LwaCas13a	<i>Leptotrichia wadei</i>	WP_021746774.1	GATTAGACTACCCCAAAAACGAAG GGGACTAAAAC (配列番号 394)

10

20

30

40

50

【表 77-2】

Cas13a3	LscCas13a	<i>Listeria seeligeri</i>	WP_012985477.1	GTAAGAGACTACCTCTATATGAAAG AGGACTAAAAC (配列番号 395)
Cas13a4	LbmCas13a	<i>Lachnospiraceae bacterium MA2020</i>	WP_044921188.1	GTATTGAGAAAAGCCAGATATAGTT GGCAATAGAC (配列番号 396)
Cas13a5	LbnCas13a	<i>Lachnospiraceae bacterium NK4A179</i>	WP_022785443.1	GTTGATGAGAAGAGCCCAAGATAG AGGGCAATAAC (配列番号 397)
Cas13a6	CamCas13a	[<i>Clostridium</i>] <i>aminophilum</i> DSM 10710	WP_031473346.1	GTCTATTGCCCTCTATATCGGGCTGT TCTCCAAAC (配列番号 398)
Cas13a7	CgaCas13a	<i>Carnobacterium gallinarum</i> DSM 4847	WP_034560163.1	ATTAAAGACTACCTCTAAATGTAAG AGGACTATAAC (配列番号 399)
Cas13a8	Cga2Cas13a	<i>Carnobacterium gallinarum</i> DSM 4847	WP_034563842.1	AATATAAACTACCTCTAAATGTAAG AGGACTATAAC (配列番号 400)
Cas13a9	Pprcas13a	<i>Paludibacter propionigenes</i> WB4	WP_013443710.1	CTTGTGGATTATCCCAAAATTGAAG GGAACATAAC (配列番号 401)
Cas13a10	LweCas13a	<i>Listeria weihenstephanensis</i> FSL R9-0317	WP_036059185.1	GATTTAGAGTACCTCAAAATAGAAG AGGTCTAAAAC (配列番号 402)
Cas13a11	LbfCas13a	<i>Listeriaceae bacterium</i> FSL M6-0635 (<i>Listeria newyorkensis</i>)	WP_036091002.1	GATTTAGAGTACCTCAAAACAAAAG AGGACTAAAAC (配列番号 403)
Cas13a12	Lwa2cas13a	<i>Leptotrichia wadei</i> F0279	WP_021746774.1	GATATAGATAACCCCAAAAACGAA GGGATCTAAAAC (配列番号 404)
Cas13a13	ResCas13a	<i>Rhodobacter capsulatus</i> SB 1003	WP_013067728.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 405)
Cas13a14	RcrCas13a	<i>Rhodobacter capsulatus</i> R121	WP_023911507.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 406)
Cas13a15	RcdCas13a	<i>Rhodobacter capsulatus</i> DE442	WP_023911507.1	GCCTCACATCACCGCCAAGACGACG GCGGACTGAAC (配列番号 407)

10

20

30

【0187】

40

本開示の例示的な野生型 Cas13a タンパク質は、配列番号 408 のアミノ酸配列を含み得るまたはそれからなり得る。

【0188】

例示的な Cas13b タンパク質としては、これだけに限定されないが、以下が挙げられる：

【表 7 8 - 1】

種	Cas13b 受託番号	Cas13b サイズ (aa)
Paludibacter propionigenes WB4	WP_013446107.1	1155
Prevotella sp. P5-60	WP_044074780.1	1091
Prevotella sp. P4-76	WP_044072147.1	1091
Prevotella sp. P5-125	WP_044065294.1	1091
Prevotella sp. P5-119	WP_042518169.1	1091
Capnocytophaga canimorsus Cc5	WP_013997271.1	1200
Phacodactylibacter xiamenensis	WP_044218239.1	1132
Porphyromonas gingivalis W83	WP_005873511.1	1136
Porphyromonas gingivalis F0570	WP_021665475.1	1136
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	WP_012458151.1	1136
Porphyromonas gingivalis F0185	ERJ81987.1	1136
Porphyromonas gingivalis F0185	WP_021677657.1	1136
Porphyromonas gingivalis SJD2	WP_023846767.1	1136
Porphyromonas gingivalis F0568	ERJ65637.1	1136
Porphyromonas gingivalis W4087	ERJ87335.1	1136
Porphyromonas gingivalis W4087	WP_021680012.1	1136
Porphyromonas gingivalis F0568	WP_021663197.1	1136
Porphyromonas gingivalis	WP_061156637.1	1136
Porphyromonas gulae	WP_039445055.1	1136
Bacteroides pyogenes F0041	ER181700.1	1116
Bacteroides pyogenes JCM 10003	WP_034542281.1	1116
Alistipes sp. ZOR0009	WP_047447901.1	954
Flavobacterium branchiophilum FL-15	WP_014084666.1	1151
Prevotella sp. MA2016	WP_036929175.1	1323
Myroides odoratimimus CCUG 10230	EHO06562.1	1160
Myroides odoratimimus CCUG 3837	EKB06014.1	1158
Myroides odoratimimus CCUG 3837	WP_006265509.1	1158
Myroides odoratimimus CCUG 12901	WP_006261414.1	1158
Myroides odoratimimus CCUG 12901	EHO08761.1	1158
Myroides odoratimimus (NZ_CP013690.1)	WP_058700060.1	1160
Bergeyella zoohelcum ATCC 43767	EKB54193.1	1225
Capnocytophaga cynodegmi	WP_041989581.1	1219
Bergeyella zoohelcum ATCC 43767	WP_002664492.1	1225
Flavobacterium sp. 316	WP_045968377.1	1156
Psychroflexus torquis ATCC 700755	WP_015024765.1	1146
Flavobacterium columnare ATCC 49512	WP_014165541.1	1180
Flavobacterium columnare	WP_060381855.1	1214
Flavobacterium columnare	WP_063744070.1	1214
Flavobacterium columnare	WP_065213424.1	1215
Chryseobacterium sp. YR477	WP_047431796.1	1146
Riemerella anatipestifer ATCC 11845 = DSM 15868	WP_004919755.1	1096
Riemerella anatipestifer RA-CH-2	WP_015345620.1	949
Riemerella anatipestifer	WP_049354263.1	949
Riemerella anatipestifer	WP_061710138.1	951
Riemerella anatipestifer	WP_064970887.1	1096
Prevotella saccharolytica F0055	EKY00089.1	1151
Prevotella saccharolytica JCM 17484	WP_051522484.1	1152
Prevotella buccae ATCC 33574	EFU31981.1	1128
Prevotella buccae ATCC 33574	WP_004343973.1	1128

10

20

30

40

50

【表 7 8 - 2】

Prevotella buccae D17	WP_004343581.1	1128
Prevotella sp. MSX73	WP_007412163.1	1128
Prevotella pallens ATCC 700821	EGQ18444.1	1126
Prevotella pallens ATCC 700821	WP_006044833.1	1126
Prevotella intermedia ATCC 25611 = DSM 20706	WP_036860899.1	1127
Prevotella intermedia	WP_061868553.1	1121
Prevotella intermedia 17	AFJ07523.1	1135
Prevotella intermedia	WP_050955369.1	1133
Prevotella intermedia	BAU18623.1	1134
Prevotella intermedia ZT	KJJ86756.1	1126
Prevotella aurantiaca JCM 15754	WP_025000926.1	1125
Prevotella pleuritidis F0068	WP_021584635.1	1140
Prevotella pleuritidis JCM 14110	WP_036931485.1	1117
Prevotella falsenii DSM 22864 = JCM 15124	WP_036884929.1	1134
Porphyromonas gulae	WP_039418912.1	1176
Porphyromonas sp. COT-052 OH4946	WP_039428968.1	1176
Porphyromonas gulae	WP_039442171.1	1175
Porphyromonas gulae	WP_039431778.1	1176
Porphyromonas gulae	WP_046201018.1	1176
Porphyromonas gulae	WP_039434803.1	1176
Porphyromonas gulae	WP_039419792.1	1120
Porphyromonas gulae	WP_039426176.1	1120
Porphyromonas gulae	WP_039437199.1	1120
Porphyromonas gingivalis TDC60	WP_013816155.1	1120
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277	WP_012458414.1	1120
Porphyromonas gingivalis A7A1-28	WP_058019250.1	1176
Porphyromonas gingivalis JCVI SC001	EOA10535.1	1176
Porphyromonas gingivalis W50	WP_005874195.1	1176
Porphyromonas gingivalis	WP_052912312.1	1176
Porphyromonas gingivalis AJW4	WP_053444417.1	1120
Porphyromonas gingivalis	WP_039417390.1	1120
Porphyromonas gingivalis	WP_061156470.1	1120

10

20

30

【0189】

本開示の例示的な野生型 *Bergeyella zoohelcum* ATCC 43767 Cas13b (BzCas13b) タンパク質は、配列番号409のアミノ酸配列を含み得るまたはそれからなり得る。

【0190】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA結合性タンパク質をコードする配列は、Cas13dタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。Cas13dは、VI-D型CRISPR-Cas系のエフェクターである。一部の実施形態では、Cas13dタンパク質は、RNAを切る(cut)またはそれに結合することができる、RNAによりガイドされるRNAエンドヌクレアーゼ酵素である。一部の実施形態では、Cas13dタンパク質は、1つまたは複数の高等真核生物および原核生物ヌクレオチド結合性(HEPN)ドメインを含み得る。一部の実施形態では、Cas13dタンパク質は、野生型HEPNドメインまたは変異型HEPNドメインのいずれかを含み得る。一部の実施形態では、Cas13dタンパク質は、RNAを切ることはできないが、ガイドRNAをプロセシングすることができる変異型HEPNドメインを含む。一部の実施形態では、Cas13dタンパク質は、プロトスペーサーランキング配列を必要としない。Cas13dタンパク質のさらなる例および配列について、限定することなく、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO公開第WO2019/040664号およびUS2019/0062724も参照されたい。

40

【0191】

50

一部の実施形態では、本開示の C a s 1 3 d 配列は、限定することなく、W O 2 0 1 9 / 0 4 0 6 6 4 の配列番号 1 ~ 2 9 6 を含み、本明細書においてもそのように番号が付けられ、これをもって含まれる。

【 0 1 9 2 】

配列番号 1 は、H E P N 部位を含有する、E u b a c t e r i u m s i r a e u m からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 3 】

配列番号 2 は、変異型 H E P N 部位を含有する、E u b a c t e r i u m s i r a e u m からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 4 】

配列番号 3 は、H E P N 部位を含有する、未培養 R u m i n o c c o c c u s s p . からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 5 】

配列番号 4 は、変異型 H E P N 部位を含有する、未培養 R u m i n o c c o c c u s s p . からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 6 】

配列番号 5 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 2 7 9 1 0 0 0 5 4 9 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 7 】

配列番号 6 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 8 5 5 0 0 0 3 1 7 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 8 】

配列番号 7 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 3 3 8 9 0 0 0 0 2 7 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 1 9 9 】

配列番号 8 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 8 0 6 1 0 0 0 1 7 0 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 0 】

配列番号 9 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 1 5 0 9 0 0 0 2 9 9 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 1 】

配列番号 1 0 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 9 5 4 9 0 0 0 5 9 1 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 2 】

配列番号 1 1 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 7 1 0 0 0 5 0 0 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 3 】

配列番号 1 2 は、ヒト胃メタゲノムからの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 4 】

配列番号 1 3 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 3 9 1 5 0 0 0 3 5 7 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 5 】

配列番号 1 4 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 4 7 1 9 0 0 0 1 7 3 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 6 】

配列番号 1 5 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 6 9 2 9 0 0 0 4 6 8 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【 0 2 0 7 】

配列番号 1 6 は、G u t _ _ m e t a g e n o m e _ _ c o n t i g 7 3 6 7 0 0 0 4 8 6 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

10

20

30

40

50

【0208】

配列番号17は、Gut__metagenome__contig7930000403からの例示的なCas13d配列である。

【0209】

配列番号18は、Gut__metagenome__contig993000527からの例示的なCas13d配列である。

【0210】

配列番号19は、Gut__metagenome__contig6552000639からの例示的なCas13d配列である。

【0211】

配列番号20は、Gut__metagenome__contigll932000246からの例示的なCas13d配列である。

【0212】

配列番号21は、Gut__metagenome__contigll2963000286からの例示的なCas13d配列である。

【0213】

配列番号22は、Gut__metagenome__contig2952000470からの例示的なCas13d配列である。

【0214】

配列番号23は、Gut__metagenome__contig451000394からの例示的なCas13d配列である。

【0215】

配列番号24は、Eubacterium__siraeum__DSM__l5702からの例示的なCas13d配列である。

【0216】

配列番号25は、gut__metagenome__P19E0k2120140920, __c369000003からの例示的なCas13d配列である。

【0217】

配列番号26は、Gut__metagenome__contig7593000362からの例示的なCas13d配列である。

【0218】

配列番号27は、Gut__metagenome__contigll2619000055からの例示的なCas13d配列である。

【0219】

配列番号28は、Gut__metagenome__contigll405000151からの例示的なCas13d配列である。

【0220】

配列番号29は、Chicken__gut__metagenome__c298474からの例示的なCas13d配列である。

【0221】

配列番号30は、Gut__metagenome__contigll516000227からの例示的なCas13d配列である。

【0222】

配列番号31は、Gut__metagenome__contigll838000319からの例示的なCas13d配列である。

【0223】

配列番号32は、Gut__metagenome__contig13123000268からの例示的なCas13d配列である。

【0224】

配列番号33は、Gut__metagenome__contig5294000434

10

20

30

40

50

からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0225】

配列番号34は、Gut__metagenome__contig6415000192からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0226】

配列番号35は、Gut__metagenome__contig6144000300からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0227】

配列番号36は、Gut__metagenome__contig9118000041からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0228】

配列番号37は、Activated__sludge__metagenome__transcript__124486からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0229】

配列番号38は、Gut__metagenome__contig1322000437からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0230】

配列番号39は、Gut__metagenome__contig4582000531からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0231】

配列番号40は、Gut__metagenome__contig9190000283からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0232】

配列番号41は、Gut__metagenome__contigl709000510からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0233】

配列番号42は、HEPNドメインを有するM24__(LSQX01212483__Anaerobic__digester__metagenome)からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0234】

配列番号43は、Gut__metagenome__contig3833000494からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0235】

配列番号44は、Activated__sludge__metagenome__transcript__117355からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0236】

配列番号45は、Gut__metagenome__contigll061000330からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0237】

配列番号46は、ヒツジ胃メタゲノムからのGut__metagenome__contig338000322からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0238】

配列番号47は、ヒト胃メタゲノムからの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0239】

配列番号48は、Gut__metagenome__contig9530000097からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0240】

配列番号49は、Gut__metagenome__contigl750000258からの例示的な Cas 13 d 配列である。

【0241】

10

20

30

40

50

配列番号 50 は、Gut__metagenome__contig5377000274 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0242】

配列番号 51 は、gut__metagenome__P19E0k2120140920__c248000089 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0243】

配列番号 52 は、Gut__metagenome__contigll400000031 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0244】

配列番号 53 は、Gut__metagenome__contig7940000191 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0245】

配列番号 54 は、Gut__metagenome__contig6049000251 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0246】

配列番号 55 は、Gut__metagenome__contigll137000500 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0247】

配列番号 56 は、Gut__metagenome__contig9368000105 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0248】

配列番号 57 は、Gut__metagenome__contig546000275 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0249】

配列番号 58 は、Gut__metagenome__contig7216000573 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0250】

配列番号 59 は、Gut__metagenome__contig4806000409 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0251】

配列番号 60 は、Gut__metagenome__contigll0762000480 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0252】

配列番号 61 は、Gut__metagenome__contig4114000374 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0253】

配列番号 62 は、Ruminococcus__flavefaciens__FD1 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0254】

配列番号 63 は、Gut__metagenome__contig7093000170 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0255】

配列番号 64 は、Gut__metagenome__contigll1113000384 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0256】

配列番号 65 は、Gut__metagenome__contig6403000259 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0257】

配列番号 66 は、Gut__metagenome__contig6193000124 からの例示的な Cas13d 配列である。

10

20

30

40

50

【0258】

配列番号67は、Gut__metagenome__contig721000619からの例示的なCas13d配列である。

【0259】

配列番号68は、Gut__metagenome__contigl666000270からの例示的なCas13d配列である。

【0260】

配列番号69は、Gut__metagenome__contig2002000411からの例示的なCas13d配列である。

【0261】

配列番号70は、Ruminococcus__albusからの例示的なCas13d配列である。

【0262】

配列番号71は、Gut__metagenome__contig13552000311からの例示的なCas13d配列である。

【0263】

配列番号72は、Gut__metagenome__contigl0037000527からの例示的なCas13d配列である。

【0264】

配列番号73は、Gut__metagenome__contig238000329からの例示的なCas13d配列である。

【0265】

配列番号74は、Gut__metagenome__contig2643000492からの例示的なCas13d配列である。

【0266】

配列番号75は、Gut__metagenome__contig874000057からの例示的なCas13d配列である。

【0267】

配列番号76は、Gut__metagenome__contig4781000489からの例示的なCas13d配列である。

【0268】

配列番号77は、Gut__metagenome__contigl2144000352からの例示的なCas13d配列である。

【0269】

配列番号78は、Gut__metagenome__contig5590000448からの例示的なCas13d配列である。

【0270】

配列番号79は、Gut__metagenome__contig9269000031からの例示的なCas13d配列である。

【0271】

配列番号80は、Gut__metagenome__contig8537000520からの例示的なCas13d配列である。

【0272】

配列番号81は、Gut__metagenome__contigl845000130からの例示的なCas13d配列である。

【0273】

配列番号82は、gut__metagenome__P13E0k2l20140920__c3000072からの例示的なCas13d配列である。

【0274】

配列番号83は、gut__metagenome__P1 E0k2l20140920

10

20

30

40

50

__c I 0 0 0 0 7 8からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 7 5】

配列番号84は、Gut__metagenome__contig l 2 9 9 0 0 0 0 0 9からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 7 6】

配列番号85は、Gut__metagenome__contig 5 2 5 0 0 0 3 4 9からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 7 7】

配列番号86は、Gut__metagenome__contig 7 2 2 9 0 0 0 3 0 2からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 7 8】

配列番号87は、Gut__metagenome__contig 3 2 2 7 0 0 0 3 4 3からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 7 9】

配列番号88は、Gut__metagenome__contig 7 0 3 0 0 0 0 4 6 9からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 0】

配列番号89は、Gut__metagenome__contig 5 1 4 9 0 0 0 0 6 8からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 1】

配列番号90は、Gut__metagenome__contig 4 0 0 2 0 0 0 4 5からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 2】

配列番号91は、Gut__metagenome__contig l 0 4 2 0 0 0 0 4 4 6からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 3】

配列番号92は、new__flavefaciens__strain__XPD3002 (C a s R x)からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 4】

配列番号93は、M26__Gut__metagenome__contig 6 9 8 0 0 0 3 0 7からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 5】

配列番号94は、M36__Uncultured__Eubacterium__sp__TS28__c 4 0 9 5 6からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 6】

配列番号95は、M12__gut__metagenome__P25C0k2l20140920__c 1 3 4 0 0 0 0 6 6からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 7】

配列番号96は、ヒト胃メタゲノムからの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 8】

配列番号97は、MlO__gut__metagenome__P25C90k2120l 4 0 9 2 0__c 2 8 0 0 0 0 4 1からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 8 9】

配列番号98は、30 Ml I__gut__metagenome__P25C7k2120140920__c 4 0 7 8 0 0 0 1 0 5からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 9 0】

配列番号99は、gut__metagenome__P25C0k2120l40920__c 3 2 0 0 0 0 4 5からの例示的なC a s 1 3 d配列である。

【0 2 9 1】

配列番号100は、M13__gut__metagenome__P23C7k2l20

10

20

30

40

50

1 4 0 9 2 0 _ c 3 0 0 0 0 6 7 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0292】

配列番号101は、M5 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P l 8 E 9 0 k 2 1 2 0 1 4 0 9 2 0 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0293】

配列番号102は、M2 l _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P l 8 E 0 k 2 1 2 0 1 4 0 9 2 0 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0294】

配列番号103は、M7 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P 3 8 C 7 k 2 1 2 0 l 4 0 9 2 0 _ c 4 8 4 l 0 0 0 0 0 3 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

10

【0295】

配列番号104は、R u m i n o c c o c c u s _ b i c i r c u l a n s からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0296】

配列番号105は、例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0297】

配列番号106は、例示的な C a s 1 3 d コンセンサス配列である。

【0298】

配列番号107は、M18 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P 2 2 E O k 2 l 2 0 1 4 0 9 2 0 _ c 3 3 9 5 0 0 0 0 7 8 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

20

【0299】

配列番号108は、M17 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P 2 2 E 9 0 k 2 1 2 0 1 4 0 9 2 0 _ c 1 1 4 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0300】

配列番号109は、R u m i n o c c o c c u s _ s p _ C A G 5 7 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0301】

配列番号110は、g u t _ m e t a g e n o m e _ P l 1 E 9 0 k 2 1 2 0 l 4 0 9 2 0 _ c 4 3 0 0 0 1 2 3 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0302】

配列番号111は、M6 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P 1 3 E 9 0 k 2 1 2 0 l 4 0 9 2 0 _ c 7 0 0 0 0 0 9 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

30

【0303】

配列番号112は、M l 9 _ g u t _ m e t a g e n o m e _ P l 7 E 9 0 k 2 1 2 0 1 4 0 9 2 0 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0304】

配列番号113は、g u t _ m e t a g e n o m e _ P l 7 E 0 k 2 1 2 0 l 4 0 9 2 0 , _ c 8 7 0 0 0 0 4 3 からの例示的な C a s 1 3 d 配列である。

【0305】

配列番号114は、例示的なヒトコドン最適化 E u b a c t e r i u m s i r a e u m C a s 1 3 d 核酸配列である。

40

【0306】

配列番号115は、変異体 H E P N ドメインを有する例示的なヒトコドン最適化 E u b a c t e r i u m s i r a e u m C a s 1 3 d 核酸配列である。

【0307】

配列番号116は、N末端 N L S を有する例示的なヒトコドン最適化 E u b a c t e r i u m s i r a e u m C a s 1 3 d 核酸配列である。

【0308】

配列番号117は、NおよびC末端 N L S タグを有する例示的なヒトコドン最適化 E u b a c t e r i u m s i r a e u m C a s 1 3 d 核酸配列である。

50

【0309】

配列番号118は、例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus* sp. Cas13d 30 核酸配列である。

【0310】

配列番号119は、変異体 HEPNDメインを有する例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus* sp. Cas13d 核酸配列である。

【0311】

配列番号120は、N末端 NLS を有する例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus* sp. Cas13d 核酸配列である。

【0312】

配列番号121は、NおよびC末端 NLS タグを有する例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus* sp. Cas13d 核酸配列である。

【0313】

配列番号122は、例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus flavefaciens* FDL Cas13d 核酸配列である。

【0314】

配列番号123は、変異型 HEPNDメインを有する例示的なヒトコドン最適化非培養 *Ruminococcus flavefaciens* FDL Cas13d 核酸配列である。

【0315】

配列番号124は、*Ruminococcus bicirculans* からの例示的な Cas13d 核酸配列である。

【0316】

配列番号125は、*Eubacterium siraeum* からの例示的な Cas13d 核酸配列である。

【0317】

配列番号126は、*Ruminococcus flavefaciens* FD1 からの例示的な Cas13d 核酸配列である。

【0318】

配列番号127は、*Ruminococcus albus* からの例示的な Cas13d 核酸配列である。

【0319】

配列番号128は、*Ruminococcus flavefaciens* XPD からの例示的な Cas13d 核酸配列である。

【0320】

配列番号129は、*E. siraeum* Cas13d についての例示的なコンセンサス DR 核酸配列である。

【0321】

配列番号130は、*Rum. Sp.* Cas13d についての例示的なコンセンサス DR 核酸配列である。

【0322】

配列番号131は、*Rum. Flavefaciens strain XPD3002* Cas13d (CasRx) についての例示的なコンセンサス DR 核酸配列である。

【0323】

配列番号132～137は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である。

【0324】

配列番号138は、7つの全長 Cas13d オルソログの例示的な50%コンセンサス配列である。

【0325】

配列番号139は、腸内メタゲノム PLEO からの例示的な Cas13d 核酸配列であ

10

20

30

40

50

る。

【0326】

配列番号140は、Anaerobic digesterからの例示的なCas13d核酸配列である。

【0327】

配列番号141は、Ruminococcus sp. CAG:57からの例示的なCas13d核酸配列である。

【0328】

配列番号142は、例示的なヒトコドン最適化未培養腸内メタゲノムPLEO Cas13d核酸配列である。

10

【0329】

配列番号143は、例示的なヒトコドン最適化Anaerobic Digester Cas13d核酸配列である。

【0330】

配列番号144は、例示的なヒトコドン最適化Ruminococcus flavefaciens XPD Cas13d核酸配列である。

【0331】

配列番号145は、例示的なヒトコドン最適化Ruminococcus albus Cas13d核酸配列である。

20

【0332】

配列番号146は、Ruminococcus sp. CAG:57 CRISPRアレイの例示的プロセッシングである。

【0333】

配列番号147は、コンティグemb|OBVH01003037.1、ヒト腸内メタゲノム配列(WGSコンティグemb|OBXZ01000094.1|およびemb|OBJFO1000033.1にも見いだされる)からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0334】

配列番号148は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である(配列番号147と組みになる)。

30

【0335】

配列番号149は、コンティグtpg|DBYI01000091.1|(ウシ腸内メタゲノムからアセンブルした未培養Ruminococcus flavefaciens UBA1190)からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0336】

配列番号150~152は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である(配列番号149と組みになる)。

【0337】

配列番号153は、コンティグtpg|DJXD01000002.1|(ヒツジ腸内メタゲノムからの未培養Ruminococcus アセンブリ、UBA7013)からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

40

【0338】

配列番号154は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である(配列番号153と組みになる)。

【0339】

配列番号155は、コンティグOGZC01000639.1(ヒト腸内メタゲノムアセンブリ)からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0340】

配列番号156~177は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である(配列番号155と組みになる)。

50

【0341】

配列番号158は、コンティグemb | OHBM01000764.1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0342】

配列番号159は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号158と組みになる)。

【0343】

配列番号160は、コンティグemb | OHCP01000044.1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0344】

配列番号161は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号160と組みになる)。

【0345】

配列番号162は、コンティグemb | LOGDF01008514.1 | (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0346】

配列番号163は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号162と組みになる)。

【0347】

配列番号164は、コンティグemb | OGPN01002610.1 (ヒト腸内メタゲノムアセンブリ) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0348】

配列番号165は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号164と組みになる)。

【0349】

配列番号166は、コンティグNFIR01000008.1 (ニワトリ腸内メタゲノムからの、Eubacterium sp. An3) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0350】

配列番号167は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号166と組みになる)。

【0351】

配列番号168は、コンティグNFLV01000009.1 (ニワトリ腸内メタゲノムからの、Eubacterium sp. An11) からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0352】

配列番号169は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号168と組みになる)。

【0353】

配列番号171～174は、例示的なCas13dモチーフ配列である。

【0354】

配列番号175は、コンティグOJMM01002900ヒト腸内メタゲノム配列からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0355】

配列番号176は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である (配列番号175と組みになる)。

【0356】

配列番号177は、コンティグODAI011611274.1腸内メタゲノム配列からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0357】

10

20

30

40

50

配列番号 178 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 177 と組みになる）。

【0358】

配列番号 179 は、コンティグ O I Z X 01000427.1 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0359】

配列番号 180 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 179 と組みになる）。

【0360】

配列番号 181 は、コンティグ emb | O C V V 012889144.1 | からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0361】

配列番号 182 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 181 と組みになる）。

【0362】

配列番号 183 は、コンティグ O C T W 011587266.1 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である

【0363】

配列番号 184 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 183 と組みになる）。

【0364】

配列番号 185 は、コンティグ emb | O G N F O 1009141.1 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0365】

配列番号 186 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 185 と組みになる）。

【0366】

配列番号 187 は、コンティグ emb | O I E N 01002196.1 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0367】

配列番号 188 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 187 と組みになる）。

【0368】

配列番号 189 は、コンティグ e - k 87__11092736 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0369】

配列番号 190～193 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 189 と組みになる）。

【0370】

配列番号 194 は、Gut__metagenome__contig6893000291 からの例示的な Cas13d 配列である。

【0371】

配列番号 195～197 は、例示的な Cas13d モチーフ配列である。

【0372】

配列番号 198 は、Ga0224415__10007274 からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0373】

配列番号 199 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 198 と組みになる）。

【0374】

10

20

30

40

50

配列番号 200 は、EMG __ l 0 0 0 3 6 4 1 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0375】

配列番号 202 は、Ga 0 1 2 9 3 0 6 __ 1 0 0 0 7 3 5 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0376】

配列番号 201 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 200 と組みになる）。

【0377】

配列番号 202 は、Ga 0 1 2 9 3 0 6 __ 1 0 0 0 7 3 5 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0378】

配列番号 203 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 203 と組みになる）。

【0379】

配列番号 204 は、Ga 0 1 2 9 3 1 7 __ 1 0 0 8 0 6 7 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0380】

配列番号 205 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 204 と組みになる）。

【0381】

配列番号 206 は、Ga 0 2 2 4 4 1 5 __ 1 0 0 4 8 7 9 2 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0382】

配列番号 207 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 206 と組みになる）。

【0383】

配列番号 208 は、1 6 0 5 8 2 9 5 8 __ g e n e 4 9 8 3 4 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0384】

配列番号 209 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 208 と組みになる）。

【0385】

配列番号 210 は、2 5 0 t w i n s __ 3 5 8 3 8 __ G L 0 1 1 0 3 0 0 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0386】

配列番号 211 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 210 と組みになる）。

【0387】

配列番号 212 は、2 5 0 t w i n s __ 3 6 0 5 0 __ G L O I 5 8 9 8 5 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0388】

配列番号 213 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 212 と組みになる）。

【0389】

配列番号 214 は、3 1 0 0 9 __ G L 0 0 3 4 1 5 3 からの例示的な Cas 1 3 d タンパク質配列である。

【0390】

配列番号 215 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 214 と組みになる）。

10

20

30

40

50

【0391】

配列番号216は、530373__GL0023589からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0392】

配列番号217は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号216と組みになる）。

【0393】

配列番号218は、BMZ-l 1B__GL0037771からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0394】

配列番号219は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号218と組みになる）。

【0395】

配列番号220は、BMZ-l 1B__GL0037915からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0396】

配列番号221は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号220と組みになる）。

【0397】

配列番号222は、BMZ-l 1B__GL006961 7からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0398】

配列番号223は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号222と組みになる）。

【0399】

配列番号224は、DLF014__GL0011914からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0400】

配列番号225は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号224と組みになる）。

【0401】

配列番号226は、EYZ-362B__GL0088915からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0402】

配列番号227～228は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号226と組みになる）。

【0403】

配列番号229は、Ga0099364 10024192からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0404】

配列番号230は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号229と組みになる）。

【0405】

配列番号231は、Ga0187910__10006931からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0406】

配列番号232は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号231と組みになる）。

【0407】

配列番号233は、Ga0187910__10015336からの例示的なCas13

10

20

30

40

50

d タンパク質配列である。

【0408】

配列番号234は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号233と組みになる）。

【0409】

配列番号235は、Ga0187910__10040531からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0410】

配列番号236は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号23と組みになる）。

【0411】

配列番号237は、Ga0187911__10069260からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0412】

配列番号238は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号237と組みになる）。

【0413】

配列番号239は、MH0288__GL0082219からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0414】

配列番号240は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号239と組みになる）。

【0415】

配列番号241は、O2.UC29-0__GL0096317からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0416】

配列番号242は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号241と組みになる）。

【0417】

配列番号243は、PIG-014__GL0226364からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0418】

配列番号244は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号243と組みになる）。

【0419】

配列番号245は、PIG-018__GL0023397からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0420】

配列番号246は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号245と組みになる）。

【0421】

配列番号247は、PIG-025__GL0099734からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0422】

配列番号248は、例示的なコンセンサスDR核酸配列である（配列番号247と組みになる）。

【0423】

配列番号249は、PIG-028__GL0185479からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0424】

10

20

30

40

50

配列番号 250 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 249 と組みになる）。

【0425】

配列番号 251 は、`-Ga0224422__10645759` からの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

【0426】

配列番号 252 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 251 と組みになる）。

【0427】

配列番号 253 は、ODAI キメラからの例示的な Cas13d タンパク質配列である。

10

【0428】

配列番号 254 は、例示的なコンセンサス DR 核酸配列である（配列番号 253 と組みになる）。

【0429】

配列番号 255 は、HEPN モチーフである。

【0430】

配列番号 256 および 257 は、それぞれ、例示的な Cas13d 核局在化シグナルアミノ酸および核酸配列である。

【0431】

配列番号 258 および 260 は、それぞれ、例示的な SV40 ラージ T 抗原核局在化シグナルアミノ酸および核酸配列である。

20

【0432】

配列番号 259 は、dCas9 標的配列である。

【0433】

配列番号 261 は、ccdB を標的とする人工 *Eubacterium siraeum* nCas1 アレイである。

【0434】

配列番号 262 は、完全 36 nt ダイレクトリピートである。

【0435】

配列番号 263 ~ 266 は、スペーサー配列である。

30

【0436】

配列番号 267 は、ccdB を標的とする人工未培養 *Ruminococcus* sp. nCas1 アレイである。

【0437】

配列番号 268 は、完全 36 nt ダイレクトリピートである。

【0438】

配列番号 269 ~ 272 は、スペーサー配列である。

【0439】

配列番号 273 は、ccdB 標的 RNA 配列である。

40

【0440】

配列番号 274 ~ 277 は、スペーサー配列である。

【0441】

配列番号 278 は、変異型 Cas13d 配列、NLS-Ga__053l (trunc) - NLS-HA である。この変異体は、非保存 N 末端の欠失を有する。

【0442】

配列番号 279 は、変異型 Cas13d 配列、NES-Ga__053l (trunc) - NES-HA である。この変異体は、非保存 N 末端の欠失を有する。

【0443】

配列番号 280 は、全長 Cas13d 配列、NLS-RfxCas13d-NLS-H

50

Aである。

【0444】

配列番号281は、変異型Cas13d配列、NLS-RfxCas13d(del5)-NLS-HAである。この変異体は、アミノ酸558～587の欠失を有する。

【0445】

配列番号282は、変異型Cas13d配列、NLS-RfxCas13d(del5.12)-NLS-HAである。この変異体は、アミノ酸558～587および953～966の欠失を有する。

【0446】

配列番号283は、変異型Cas13d配列、NLS-RfxCas13d(del5.13)-NLS-HAである。この変異体は、アミノ酸376～392および558～587の欠失を有する。

10

【0447】

配列番号284は、変異型Cas13d配列、NLS-RfxCas13d(del5.12+5.13)-NLS-HAである。この変異体は、アミノ酸376～392、558～587、および953～966の欠失を有する。

【0448】

配列番号285は、変異型Cas13d配列、NLS-RfxCas13d(dell3)-NLS-HAである。この変異体は、アミノ酸376～392の欠失を有する。

【0449】

配列番号286は、ADAR2の発現を編集するために使用されるエフェクター配列である。アミノ酸1～969は、dRfxCas13であり、aa970～991は、NLS配列であり、アミノ酸992～1378は、ADAR2DDである。

20

【0450】

配列番号287は、例示的なHIVNESタンパク質配列である。

【0451】

配列番号288～291は、例示的なCas13dモチーフ配列である。

【0452】

配列番号292は、Cas13dオルソログ配列MH_4866である。

【0453】

配列番号293は、037__-__embLOIZA01000315.11からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

30

【0454】

配列番号294は、PIG-022GL0026351からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0455】

配列番号295は、PIG-046__GL0077813からの例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0456】

配列番号296は、pig__chimeraからの例示的なCas13dタンパク質配列である。

40

【0457】

配列番号297は、Ruminococcus flavefaciens XPD3002(CasRx)からの例示的なヌクレアーゼ不活性または失活Cas13d(dCas13d)タンパク質配列である。

【0458】

配列番号298は、例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0459】

配列番号299は、(コンティグtpg|DJXD01000002.1|;ヒツジ腸内メタゲノムからの未培養Ruminococcusアセンブリ、UBA7013)から

50

の例示的なCas13dタンパク質配列である。

【0460】

配列番号300は、Cas13d（コンティグtpg | DJXD01000002.1 | ; ヒツジ腸内メタゲノムからの未培養Ruminococcusアセンブリ、UBA7013）からの例示的なCas13dダイレクトリピートヌクレオチド配列である（配列番号299と組みになる）。

【0461】

配列番号301は、例示的なCas13dタンパク質コンティグemb | OBLI01020244である。

【0462】

Yan et al. (2018) Mol Cell. 70(2):327-339 (doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.2018) およびKoner mann et al. (2018) Cell 173(3):665-676 (doi: 10.1016/j.cell/2018.02.033) には、Cas13dタンパク質が記載されており、これらの両方は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。WO公開番号WO2018/183403 (Cas13dであるCasM) およびWO2019/006471 (Cas13d) も参照されたく、これらは、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0463】

配列番号586は、不活性化Cas13dまたはdCas13dと呼ばれる、触媒活性のない例示的なcas13dである。

【0464】

配列番号587は、不活性化Cas13dまたはdCas13dと呼ばれる、触媒活性のない例示的なcas13dである。

【0465】

配列番号588は、不活性化Cas13dまたはdCas13dと呼ばれる、触媒活性のない例示的なcas13dである。

【0466】

配列番号589は、不活性化Cas13dまたはdCas13dと呼ばれる、触媒活性のない例示的なcas13dである。

【0467】

配列番号303は、Eubacterium siraeumからの例示的なCasMタンパク質である。

【0468】

配列番号304は、Ruminococcus sp.、2789STDY5834971分離株からの、例示的なCasMタンパク質である。

【0469】

配列番号305は、Ruminococcus bicirculansからの例示的なCasMタンパク質である。

【0470】

配列番号306は、Ruminococcus sp.、2789STDY5608892分離株からの、例示的なCasMタンパク質である。

【0471】

配列番号307は、Ruminococcus sp.、CAG:57からの、例示的なCasMタンパク質である。

【0472】

配列番号308は、Ruminococcus flavefaciens FD-1からの例示的なCasMタンパク質である。

【0473】

配列番号309は、Ruminococcus albus KH2T6株からの、例

10

20

30

40

50

示的な CasM タンパク質である。

【0474】

配列番号310は、*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002株からの例示的な CasM タンパク質である。

【0475】

配列番号311は、*Ruminococcus* sp.、2789STDY5834894分離株からの、例示的な CasM タンパク質である。

【0476】

配列番号312は、例示的な RtcB ホモログである。

【0477】

配列番号313は、*Eubacterium siraeum*からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0478】

配列番号314は、*Ruminococcus* sp. 2789STDY5834971分離株からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0479】

配列番号315は、*Ruminococcus bicirculans*からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0480】

配列番号316は、*Ruminococcus* sp. 2789STDY5608892分離株からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0481】

配列番号317は、*Ruminococcus* sp. CAG:57からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0482】

配列番号318は、*Ruminococcus flavefaciens* FD-1からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0483】

配列番号319は、*Ruminococcus albus* KH2T6株からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0484】

配列番号320は、*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002株からの例示的な WYL + C 末端 NLS である。

【0485】

配列番号321は、*Eubacterium siraeum*からの例示的な RtcB + C 末端 NLS である。

【0486】

配列番号322は、*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002 Cas13d (CasRx) の例示的なダイレトリピート配列である。

【0487】

配列番号530は、例示的な Cas13d 核酸配列、seq198である。

【0488】

配列番号535は、例示的な Cas13d 核酸配列、seq179である。

【0489】

配列番号538は、例示的な Cas13d 核酸配列、seq42である。

【0490】

配列番号540は、例示的な Cas13d 核酸配列、seq212である。

【0491】

配列番号537は、配列番号538に対応する例示的な DR 核酸配列をコードする例示的な核酸配列である。

10

20

30

40

50

【0492】

【0493】

本開示の例示的な野生型 Cas13d タンパク質は、アミノ酸配列の配列番号 92 または配列番号 298 (CasRx としても公知の Cas13d タンパク質) を含み得るまたはそれからなり得る。

【0494】

Ruminococcus flavefaciens XPD3002 Cas13d (CasRx) の例示的なダイレクトリピート配列は、核酸配列: AACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGAAAC (配列番号 302) を含む。

gRNA 標的配列

【0495】

本開示の組成物は、病原性リピート配列を含む RNA 分子の標的配列に結合し、それを破壊する。一実施形態では、標的 RNA は、RNA によりガイドされる RNA 結合性タンパク質に対応するガイド RNA のスペーサー配列に対応する配列モチーフを含む。一部の実施形態では、1 つまたは複数の標的配列を標的とするために 1 つまたは複数のスペーサー配列が使用される。一部の実施形態では、複数の標的 RNA を標的とするために複数のスペーサーが使用される。そのような標的 RNA は、同じ RNA 分子内の異なる標的部位であることもあり、または異なる RNA 分子内の異なる標的部位であることもある。スペーサー配列は、非コード RNA を標的することもできる。一部の実施形態では、複数のプロモーター、例えば、Pol III プロモーターを使用して、複数の標的 RNA を標的とするために gRNA 内の複数のスペーサーを駆動することができる。一実施形態では、標的 RNA または標的配列モチーフの分解は、病原性 CUG リピート RNA の発現を低下させ、それによって、DM1 が処置される、および／または DM1 に関連する 1 つもしくは複数の症状が好転する。

【0496】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、標的 RNA の配列モチーフは、疾患または障害のシグネチャーである。

【0497】

本開示の標的配列モチーフは、ゲノム配列内に見いだされる外来または外因性配列の配列から単離し得るまたはそれに由来し得、したがって、本開示の mRNA 分子または本開示の RNA 配列内に見いだされる外来または外因性配列の配列に翻訳される。

【0498】

本開示の標的配列モチーフは、疾患または障害を引き起こす、内因性配列内の変異を含み得るまたはそれからなり得る。変異は、配列の置換、逆位、欠失、挿入、転位、またはこれらの任意の組合せを含み得る、それからなり得る、その近くに位置し得る、またはそれと関連し得る。

【0499】

本開示の標的配列モチーフは、リピート配列を含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態では、リピート配列は、マイクロサテライト不安定性 (MSI) に関連し得る。1 つまたは複数の遺伝子座における MSI は、本開示の細胞の DNA ミスマッチ修復機構が損なわれたことに起因する。DNA の超可変配列は、超可変配列を含むまたはそれからなる標的配列を含む本開示の mRNA に転写され得る。

【0500】

本開示の標的配列モチーフは、バイオマーカーを含み得るまたはそれからなり得る。バイオマーカーは、疾患または障害が発生するリスクを示すものであり得る。バイオマーカーは、健康な遺伝子 (疾患または障害が発生することの確定可能なリスクが低いまたはリスクがない) を示すものであり得る。バイオマーカーは、編集された遺伝子を示すものであり得る。例示的なバイオマーカーとしては、これだけに限定されないが、一塩基多型 (SNP)、配列バリエーションまたは変異、エピジェネティックマーク、スプライスアクセプター部位、外因性配列、異種配列、およびこれらの任意の組合せが挙げられる。

【0501】

本開示の配列モチーフは、二次構造、三次構造または四次構造を含み得るまたはそれからなり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、内因性または天然に存在するものであり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、誘導されたまたは天然に存在しないものであり得る。二次構造、三次構造または四次構造は、内因性配列、外因性配列、または異種配列にコードされるものであり得る。

【0502】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から100個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から50個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、2個から20個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、20個から30個の間のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、終点を含めて、約26個のヌクレオチドまたは核酸塩基を含むまたはそれからなる。

10

【0503】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は連続している。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は連続していない。例えば、RNA分子の標的配列は、標的配列のヌクレオチド間に1つまたは複数の断続的なヌクレオチドが位置することに起因して連続していない1つまたは複数のヌクレオチドまたは核酸塩基を含み得るまたはそれからなり得る。

20

【0504】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、天然に存在するものである。一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、天然に存在しないものである。例示的な天然に存在しない標的配列は、配列バリエーションもしくは変異、キメラ配列、外因性配列、異種配列、キメラ配列、組換え配列、改変もしくは合成されたヌクレオチドを含む配列またはこれらの任意の組合せを含み得るまたはそれからなり得る。

【0505】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示のガイドRNAに結合する。本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の1つまたは複数の標的配列は、本開示の1つまたは複数のガイドRNAスペーサー配列に結合する。

30

【0506】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示の第1のRNA結合性タンパク質に結合する。

【0507】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、RNA分子の標的配列は、本開示の第2のRNA結合性タンパク質に結合する。

【0508】

本開示の組成物は、標的毒性CUG RNAリピート配列に特異的に結合するスペーサー配列を含むgRNAを含む。一部の実施形態では、標的CUG RNAリピート配列に結合するスペーサーは、約20個から30個のヌクレオチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、gRNAは、1つまたは複数のスペーサー配列を含む。

40

【0509】

RNA分子の標的CUG配列に特異的に結合する、本開示の例示的なgRNAスペーサー配列は、配列番号457～459に示される。

エンドヌクレアーゼ

【0510】

一部の実施形態では、本開示の組成物は、ヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼドメ

50

インを含むまたはそれからなる、第2のRNA結合性タンパク質を含む。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エフェクタータンパク質である。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAと会合する様式でRNAに結合する。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAを切断する(cleave)様式でRNAと会合する。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、PUF、PUMBYまたはPPRに基づくタンパク質である、第1のRNA結合性タンパク質と融合している。一実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、不活性化されているCasに基づく(dCasに基づく)タンパク質である、第1のRNA結合性タンパク質と融合している。

【0511】

10

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNaseを含むまたはそれからなる。

【0512】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase1を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1タンパク質は、配列番号325を含むまたはそれからなる。

【0513】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase4を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase4タンパク質は、配列番号配列番号326を含むまたはそれからなる。

20

【0514】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase6を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase6タンパク質は、配列番号配列番号327を含むまたはそれからなる。

【0515】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase7を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase7タンパク質は、配列番号配列番号328を含むまたはそれからなる。

【0516】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase8を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase8タンパク質は、配列番号配列番号329を含むまたはそれからなる。

30

【0517】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase2を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase2タンパク質は、配列番号配列番号330を含むまたはそれからなる。

【0518】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase6PLを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase6PLタンパク質は、配列番号配列番号331を含むまたはそれからなる。

40

【0519】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNaseLを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNaseLタンパク質は、配列番号配列番号332を含むまたはそれからなる。

【0520】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNaseT2を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNaseT2タンパク質は、配列番号配列番号333を含むまたはそれからなる。

【0521】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNase11を含むまたは

50

それからなる。一部の実施形態では、RNase1タンパク質は、配列番号配列番号334を含むまたはそれからなる。

【0522】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNaseT2様を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNaseT2様タンパク質は、配列番号配列番号335を含むまたはそれからなる。

【0523】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNaseである。

【0524】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (K41R)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (K41R) ポリペプチドは、配列番号336を含むまたはそれからなる。

【0525】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (K41R、D121E)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (K41R、D121E)) ポリペプチドは、配列番号337を含むまたはそれからなる。

【0526】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (K41R、D121E、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (K41R、D121E、H119N)) ポリペプチドは、配列番号338を含むまたはそれからなる。

【0527】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (H119N)) ポリペプチドは、配列番号339を含むまたはそれからなる。

【0528】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。

【0529】

一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドは、配列番号340を含むまたはそれからなる。

【0530】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E)) ポリペプチドは、配列番号341を含むまたはそれからなる。

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、変異型RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89D、R91D)) ポリペプチドは、配列番号342を含むまたはそれからなる。

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、配列番号343を含むまたはそれからなる変異型RNase1 (RNase1 (R39D、N67D、N88A、G89

10

20

30

40

50

D、R 9 1 D、H 1 1 9 N、K 4 1 R、D 1 2 1 E)) ポリペプチドである。

【0531】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、NOB1ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、NOB1ポリペプチドは、配列番号344を含むまたはそれからなる。

【0532】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼV (ENDO V) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDO Vタンパク質は、配列番号345を含むまたはそれからなる。

10

【0533】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼG (ENDOG) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDOGタンパク質は、配列番号346を含むまたはそれからなる。

【0534】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼD1 (ENDOD1) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ENDOD1タンパク質は、配列番号配列番号347を含むまたはそれからなる。

【0535】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトフラップエンドヌクレアーゼ-1 (hFEN1) を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hFEN1ポリペプチドは、配列番号348を含むまたはそれからなる。

20

【0536】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、DNA修復エンドヌクレアーゼXPF (ERCC4) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERCC4ポリペプチドは、配列番号349を含むまたはそれからなる。

【0537】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、エンドヌクレアーゼIII様タンパク質1 (NTHL) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、NTHLポリペプチドは、配列番号340を含むまたはそれからなる。

30

【0538】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトSchlafen14 (hSLFN14) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hSLFN14ポリペプチドは、配列番号351を含むまたはそれからなる。

【0539】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヒトベータラクタマーゼ様タンパク質2 (hLACTB2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hLACTB2ポリペプチドは、配列番号352を含むまたはそれからなる。

40

【0540】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン／脱ピリミジン (AP) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (APEX) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリン／脱ピリミジン (AP) エンドデオキシリボヌクレアーゼ (APEX2) ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、APEX2ポリペプチドは、配列番号353を含むまたはそれからなる。

【0541】

一部の実施形態では、APEX2ポリペプチドは、配列番号354を含むまたはそれからなる。

50

【0542】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、脱プリンまたは脱ピリミジン部位リアーゼ（APEX1）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、APEX1ポリペプチドは、配列番号355を含むまたはそれからなる。

【0543】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、アンジオゲニン（ANG）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ANGポリペプチドは、配列番号356を含むまたはそれからなる。

【0544】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、熱応答タンパク質12（HRSP12）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、HRSP12ポリペプチドは、配列番号357を含むまたはそれからなる。

【0545】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ジンクフィンガーCCCCH型、12A含有（ZC3H12A）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZC3H12Aポリペプチドは、ポリペプチドのエンドヌクレアーゼドメインであり、これは、配列番号358を含むまたはそれからなり、本明細書でE17とも称される。一部の実施形態では、ZC3H12Aポリペプチドは、配列番号359を含むまたはそれからなる。

【0546】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、反応性中間体イミンデアミナーゼA（RIDA）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RIDAポリペプチドは、配列番号360を含むまたはそれからなる。

【0547】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ホスホリパーゼDファミリーメンバー6（PDL6）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、PDL6ポリペプチドは、配列番号361を含むまたはそれからなる。

【0548】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ミトコンドリアリボヌクレアーゼP触媒サブユニット（KIAA0391）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、KIAA0391ポリペプチドは、配列番号362を含むまたはそれからなる。

【0549】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、アルゴノート2（AGO2）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。

本開示の組成物の一部の実施形態では、AGO2ポリペプチドは、配列番号363を含むまたはそれからなる。

【0550】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ミトコンドリアヌクレアーゼEXOG（EXOG）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、EXOGポリペプチドは、配列番号364を含むまたはそれからなる。

【0551】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ジンクフィンガーCCCCH型、12D含有（ZC3H12D）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZC3H12Dポリペプチドは、配列番号365を含むまたはそれからなる。

【0552】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、小胞体－核シグナル伝達2（ERN2）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERN2ポリペプチドは、配列番号366を含むまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0553】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ペロタmRNA生存およびリボソーム救済因子（PELO）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、PELOポリペプチドは、配列番号367を含むまたはそれからなる。

【0554】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、YBEYメタロペプチダーゼ（YBEY）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、YBEYポリペプチドは、配列番号368を含むまたはそれからなる。

【0555】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、切断およびポリアデニル化特異的因子4様（CPSF4L）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、CPSF4Lポリペプチドは、配列番号369を含むまたはそれからなる。

【0556】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、hCG__2002731ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、hCG__2002731ポリペプチドは、配列番号370を含むまたはそれからなる。

【0557】

一部の実施形態では、hCG__2002731ポリペプチドは、配列番号371を含むまたはそれからなる。

【0558】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、除去修復相互補化グループ1（ERCC1）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ERCC1ポリペプチドは、配列番号372を含むまたはそれからなる。

【0559】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ras関連C3ボツリヌス毒素基質1アイソフォーム（RAC1）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAC1ポリペプチドは、配列番号373を含むまたはそれからなる。

【0560】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、リボヌクレアーゼAA1（RAA1）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAA1ポリペプチドは、配列番号374を含むまたはそれからなる。

【0561】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、Ras関連タンパク質（RAB1）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RAB1ポリペプチドは、配列番号375を含むまたはそれからなる。

【0562】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、DNA複製ヘリカーゼ／ヌクレアーゼ2（DNA2）ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、DNA2ポリペプチドは、配列番号376を含むまたはそれからなる。

【0563】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、FLJ35220ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、FLJ35220ポリペプチドは、配列番号377を含むまたはそれからなる。

【0564】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、FLJ13173ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、FLJ13173ポリペプチドは、配列番号378を含むまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

【0565】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、Teneurin膜貫通タンパク質(TENM)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、Teneurin膜貫通タンパク質1(TENM1)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TENM1ポリペプチドは、配列番号379を含むまたはそれからなる。

一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、Teneurin膜貫通タンパク質2(TENM2)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TENM2ポリペプチドは、配列番号380を含むまたはそれからなる。

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、リボヌクレアーゼカパ(RNaseK)ポリペプチドを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、RNaseKポリペプチドは、配列番号381を含むまたはそれからなる。

10

【0566】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、転写活性位因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)ポリペプチドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TALENポリペプチドは、配列番号382を含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、TALENポリペプチドは、配列番号383を含むまたはそれからなる。

【0567】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ジンクフィンガーヌクレアーゼポリペプチドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ZNF638ポリペプチドまたはそのヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ZNF638ポリペプチドは、配列番号384を含むまたはそれからなる。

20

【0568】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、一般にテロメラーゼ結合性タンパク質EST1Aアイソフォーム3、NCBI参照配列：NP_001243756.1としても公知のヒトSMG6タンパク質に由来するPINドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、例えば、これだけに限定することなく、hSMG6由来のPINは、本明細書では、Cas融合タンパク質の形態で、内部対照として使用される。一部の実施形態では、PINポリペプチドは、配列番号598を含むまたはそれからなる。

30

【0569】

【0570】

本開示の組成物の一部の実施形態では、組成物は、(a)RNA分子の内部に特異的に結合するgRNAを含む配列および(b)ヌクレアーゼをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、CRISPR/Casタンパク質から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、TALENまたはそのヌクレアーゼドメインから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはそのヌクレアーゼドメインから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。

40

AAVベクター

【0571】

「AAVベクター」は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数の核酸分子および1つまたは複数のAAV末端逆位反復配列(ITR)を含む、それらから本質的になるまたはそれからなるベクターを指す。一部の態様では、核酸分子は、本開示のCAGリポート標的化タンパク質および／または組成物をコードする。そのようなAAVベクターは、例えば宿主細胞へのトランスフェクションにより、repおよびcap遺伝子産物の機能を提供する宿主細胞に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子にパッケージングされ得る。一部の態様では、AAVベクターは、プロモーターを含有し、少なくとも1つの

50

タンパク質もしくはRNAをコードし得る少なくとも1つの核酸を含有し、ならびに／または感染性AAV粒子にパッケージングされるエンハンサーおよび／もしくはターミネーターをフランキングITR内に含有する。カプシド封入核酸部分は、AAVベクターゲノムと呼ばれ得る。AAVベクターを含有するプラスミドは、製造のためのエレメント、例えば、抗生物質耐性遺伝子、複製起点配列なども含有し得るが、これらは、カプシドに封入されず、したがって、AAV粒子の一部を形成しない。

【0572】

一部の態様では、AAVベクターは、本開示のCUGリピート標的化組成物をコードする少なくとも1つの核酸分子を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つの調節配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つのAAV末端逆位(ITR)配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、第1のITR配列および第2のITR配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つのプロモーター配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つのエンハンサー配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つのポリA配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、少なくとも1つのリンカー配列を含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、少なくとも1つの核局在化シグナルを含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、CUGリピート標的化PUFまたはPUMBYタンパク質、ペプチド、またはその断片を含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、Casタンパク質、ペプチド、またはその断片を含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、エンドヌクレアーゼタンパク質、ペプチド、またはその断片を含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、ガイドRNA、一部の場合にはCUGリピート標的化ガイドRNAを含み得る。一部の態様では、本開示のAAVベクターは、これだけに限定されないが、CUGリピート標的化タンパク質(例えば、Cas、PUF、またはPUMBY)およびエンドヌクレアーゼを含む、本開示の1つまたは複数のエレメントを含む、融合タンパク質を含み得る。必要に応じて、AAVベクターの融合タンパク質は、本開示の1つまたは複数のエレメント間にリンカーアミノ酸配列をさらに含み得る。

【0573】

一部の態様では、AAVベクターは、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、CUGリピート標的化組成物核酸分子、調節配列、および第2のAAV ITR配列を含み得る。一部の態様では、AAVベクターは、5'から3'方向に、第1のAAV ITR配列、プロモーター配列、導入遺伝子核酸分子、および第2のAAV ITR配列を含み得る。

CUG標的化Cas13dベクター

【0574】

本開示の組成物の一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物は、AAVユニタリーベクターとしてパッケージングされる。一部の実施形態では、AAVユニタリーベクターとしてパッケージングされるCUG標的化Cas13d組成物は、配列番号518、528、534、536、および539で示される。

【0575】

一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物は、5'から3'へ：ヒトU6プロモーター、cas13d gRNA(この場合のgRNAは、ダイレクトリピート配列およびCUG標的化スパーサー配列を含む)、EFSプロモーター、コザック配列、SV40 NLS配列、リンカー配列、Cas13dをコードする配列、リンカー配列、SV40 NLS配列、リンカー配列、HAタグ配列、およびBGH配列を含む。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物をコードする核酸は、配列番号518で示される。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物は、表3に描示されるように配列される。

【0576】

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3: AAVユニタリーベクターにパッケージングするための CUG 標的化Cas13d組成分

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
ヒト U6 プロモーター	gagggcctatttcccatgattccttcataattgcataacgatacaaggcgttagagagataattggaattaatgtactgtlaaacacaagat atlagtacaataacgtgacgttagaaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgtttaaaaggactatcatatgcttaccgta acttgaaaglatucgatttcttggctttatatacttGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号 519)
CasR _h ダイレクトリポート(DR)	AAACCCCTACCAACTGGTCGGGGTTTGA AAC (配列番号 302)
スパーサー(CTGガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)
EFS プロモーター	TAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACAGTCCCGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGATCCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGC CTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGACGTAGTCCCGTGAACGT TCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG (配列番号 520)
コザック配列	AGAACCATG (配列番号 546)
SV-40 NLS	CCCAAGAAgAAGAGAAAGGTG (配列番号 524)
リンカー	GAGGCCAGC (配列番号 521)
CasR _x	ATCGAAAAAAAAAAGTCCTTCGCCAAGGGCATGGGCGTGAAGTCCACACTCGTGT CCGGCTCCAAAGTGTACATGACAACCTTCGCCGAAGGCAGCGACGCCAGGCTGGA AAAGATCGTGGAGGGCGACAGCATCAGGAGCGTGAATGAGGGCGAGGGCTTCAG CGCTGAAATGGCCGATAAAAAACGCCGGCTATAAGATCGGCAACGCCAAATTCAGC CATCCTAAGGGCTACGCCGTGGTGGCTAAACAACCTCTGTATACAGGACCCGTC GCAGGATATGCTCGGCCCTGAAGGAAACTCTGGAAAAGAGGTACTTCGGCGAGAGC GCTGATGGCAATGACAATATTTGTATCCAGGTGATCCATAACATCCCTGGACATTGA AAAAATCCTCGCCGAATACATTACCAACGCCGCCCTACGCCGTCAACAATATCTCCG GCCTGGATAAGGACATTATTGGATTTCGGCAAGTTCTCCACAGTGTATACCTACGAC GAATTCAAAGACCCCGAGCACCATAGGGCCGCTTTCAACAATAACGATAAGCTCA TCAACGCCATCAAGGCCCAGTATGACGAGTTCGACAACCTTCCTCGATAACCCCAGA CTCGGCTATTTTCGGCCAGGCCCTTTTTCAGCAAGGAGGGCAGAAATTACATCATCAA TTACGGCAACGAATGCTATGACATTCTGGCCCTCCTGAGCGGACTGAGGCACTGGG TGGTCCATAACAACGAAGAAGAGTCCAGGATCTCCAGGACCTGGCTCTACAACCT CGATAAGAACCTCGACAACGAATACATCTCCACCCTCAACTACCTCTACGACAGG ATCACCAATGAGCTGACCAACTCCTTCTCCAAGAACTCCGCCGCCAACGTGAACCTA TATTGCCGAAACTCTGGGAATCAACCCTGCCGAATTCGCCGAACAATATTTCAGAT TCAGCATTATGAAAGAGCAGAAAAACCTCGGATTCAATATCACCAAGCTCAGGGA AGTGATGCTGGACAGGAAGGATATGTCCGAGATCAGGAAAAATCATAAGGTGTTT GACTCCATCAGGACCAAGGTCTACACCATGATGGACTTTGTGATTATAGGTATTA CATCGAAGAGGATGCCAAGGTGGCTGCCGCCAATAAGTCCCTCCCGGATAATGAG AAGTCCCTGAGCGAGAAGGATATCTTTGTGATTAACCTGAGGGGCTCCTTCAACGA CGACCAGAAGGATGCCCTCTACTACGATGAAGCTAATAGAATTTGGAGAAAAGCTC GAAAAATATCATGCACAACATCAAGGAATTTAGGGGAAACAAGACAAGAGAGTAT AAGAAGAAGGACGCCCTAGACTGCCCAGAATCCTGCCCGCTGGCCGTGATGTTT CCGCCCTCAGCAAACTCATGTATGCCCTGACCATGTTCTGGATGGCAAGGAGATC AACGACCTCCTGACCACCCTGATTAATAAATTCGATAACATCCAGAGCTTCCTGAA

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	GGTGATGCCTCTCATCGGAGTCAACGCTAAGTTCTGGAGGAATACGCCTTTTCA AAGACTCCGCCAAGATCGCCGATGAGCTGAGGCTGATCAAGTCCTTCGCTAGAAT GGGAGAACCTATTGCCGATGCCAGGAGGGCCATGTATATCGACGCCATCCGTATTT TAGGAACCAACCTGTCTATGATGAGCTCAAGGCCCTCGCCGACACCTTTTCCCTG GACGAGAACGGAAACAAGCTCAAGAAAGGCAAGCACGGCATGAGAAATTTTCA ATTAATAACGTGATCAGCAATAAAAGGTTCCACTACCTGATCAGATACGGTGATCC TGCCACCTCCATGAGATCGCCAAAAACGAGGCCGTGGTGAAAGTTCTGCTCGGC AGGATCGCTGACATCCAGAAAAACAGGGCCAGAACGGCAAGAACAGATCGAC AGGTACTACGAAACTTGTATCGGAAAGGATAAGGGCAAGAGCGTGAGCGAAAAG GTGGACGCTCTACAAAGATCATCACCGGAATGAACTACGACCAATTCGACAAAG AAAGGAGCGTCATTGAGGACACCGGCAGGGAAAAACGCCGAGAGGGAGAAGTTTA AAAAAGATCATCAGCCTGTACCTCACCGTGATCTACCACATCCTCAAGAATATTGTC AATATCAACGCCAGGTACGTATCGGATTCCATTGCGTCGAGCGTGATGCTCAACT GTACAAAGGAGAAAAGGCTACGACATCAATCTCAAGAACTGGAAGAGAAGGGATT CAGCTCCGTCACCAAGCTCTGCGCTGGCATTGATGAACTGCCCCCGATAAGAGA AAGGACGTGGAAGGAGATGGCTGAAAGAGCCAAAGGAGAGCATTGACAGCCTC GAGAGCGCCAAACCCCAAGCTGTATGCCAATTACATCAATACAGCGACGAGAAGA AAGCCGAGGAGTTACCAAGGCAGATTAACAGGGAGAAGGCCAAAAACGCCCTGA ACGCCCTACCTGAGGAACACCAAGTGGAATGTGATCATCAGGGAGGACCTCTGAG AATTGACAACAAGACATGTACCCTGTTCAAGAACAGGCCGTCCACCTGGAAGTG GCCAGGTATGTCCACGCCATATCAACGACATTGCCGAGGTCAATTCCTACTTCCA ACTGTACCATTAATCATGCAGAGAATTATCATGAATGAGAGGTACGAGAAAAAGC AGCGGAAAAGGTGTCCGAGTACTTCGACGCTGTGAATGACGAGAAAGATACAACG ATAGGCTCCTGAAACTGCTGTGTGTGCTTTTCGGCTACTGTATCCCCAGGTTTAA AACCTGAGCATCGAGGCCCTGTTGATAGGAACGAGGCCGCCAAGTTTCGACAAAG AGAAAAAGAAAGGTGTCCGGCAATTCC (配列番号 144)
リンカー	GGATCCgga (配列番号 523)
SV40 NLS	Cetaagaaaaagaggaaggtg (配列番号 532)
リンカー	Ggggccgt (配列番号 525)
HA タグ	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT (配列番号 526)
BGH ポリア	TGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTTCCTTGAC CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC ATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAA GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATG GC (配列番号 527)

10

20

30

40

50

【0577】

一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物を含む AAV ベクターは、5' から 3' へ：ヒト U6 プロモーター、cas13d gRNA (この場合の gRNA は、ダイレトリピート配列および CUG 標的化スパーサー配列を含む)、EFS プロモーター、コザック配列、Cas13d をコードする配列、リンカー配列、SV40 NLS 配列、および SV40 ポリア配列を含む。一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物をコードする核酸は、配列番号 528 で示される。一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物は、表 4 に描示されるように配列される。

【0578】

【表 4 - 1】

表4: AAV ユニタリーベクターにパッケージングするための CUG 標的化 Cas13d 組成物

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
ヒト U6 プロモーター	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG AGAGATAAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAATACG TGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGACAGTTTTAAAATTATGTTTTAA AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATA TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号 519)
Seq198 ダイレトリピート (DR)	Caagtaaaccectaccaagtgctggggttgaaac (配列番号 199)
スパーサー (CTG ガイド 3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)

【表 4 - 2】

EFS プロモーター	TAGGTCCTGAAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGGCCGTGAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGGAGGGGTCGCAATTGATCCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTCCGCTCCGC CTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAGTACGCCGTGAACGT TCTTTTTCGCAACGGGTTTCCCGCCAGAACACAGG (配列番号 520)
コザック配列	ggcgccaccATG (配列番号 529)
Cas13d Seq198	ATCGAAAAGAAGAGCTACGCTAAAAGGAATGGGCCTGAAAAGCACCATCGTGT CCGGCTCTAAAGTGTACATGACAACCTTCGGCGATGGCAGCGAGGCCAGACTGGA GAAGGTGGTTGAGAACGATAGCATCAAGACCCTGCACGAGGGCGAGGCCCTTCAGC GCTGAGATGACCGACAACAACGCCGGCTATAAGATCGGAAACGTGAAGTTCTCCC ACCCTAACGGCTACGACGTGGTCGCCAACAAACCTTTCTACACCGGCCCTGTGCAG CAGGACATGCTGGGCCTGAAAAGAAATCCTGGAAAAGACGGTACTTTGGATCTAGCA CAGACGGTAACATAACCATCTGCATCCAAATCATCCACAATATCCTGGATATCGAA AAAATTCTGGCAGAGTACATCACAACCGCAGTGTACGCCACCAACAACATCATCG ATCCTGATAACGACGTGATCGGCCGCAAGAAGTTCACCGAGCATTAACACCTTCGC CCAGTTCTCCGCCAGCGACAGCAGCAACGATTTTCGAGCAGTTCTCGAAAAATCCCA GACTCGGCTACCTGGGCAAGGCCTTTTCTACAAGGACGGCAAGCGGAACAACAG ACAGAAGGATCCTATCGAGTGTACACCTGCTGGCCCTGCTGTGGGCCCTGCGTA ATTGGGTTGTGCAACAACAGAGGAAAAGGACCTGATCAAGTACACCTGGTTGTA TAACCTGGACAAGTACCTGGATGCCGAGTACATCACCACCCTGAACTACATGTACA ACGACATCGGCGACGAGTTGACGGACTCTTTCTCCAAGAACAGCGCCGCCAATAT CAACTACATCGCCGAGACCCTGGGAATCGACCCCAAGACCTTCGCCGAGCAATAC TTCCGGTTCTCTATCATGAAGGAACAGAAAAACCTGGGATTCACCTGACCAAGCT GAGAGAGGTGATGCTGGACCGGAAGGACATGAGCGAGATCAGAGAGAACCACAA CGAGTTGATTTCTATCAGAGCCAAGGTGTACACAATGATGGACTTCGTGATATC GGTACTACATCGAAGAGGCCGCTAAGGTGAACGCCGCCAACAGAGCCTGCCCGA CAACGAGAAGAGCCTGAGCGAGAAAGACATCTTCGTGATTTCACTCAGAGGCAGC TTCAACGAAGATCAGAAGGATCGGCTGTACTACGACGAGGCGCAAGAGCTGTGGT CCAAAGGTGGGCAAACTGATGCTGAAAATCAAGAAGTTCCGGGGCAAGGCAACAG AAAGTACAAGAAATATGGGCACACCTAGAATCCGGAGGCTGATCCCTGAGGGCAGA GATATCAGCACCTTCTCCAAGCTGATGTACGCTCTGACTATGTTCTGGACGGCA GGAGATCAATGACCTGCTGACCACTGATCAACAAATTCGACAACATCCAGAGC TTCTTAAAGGTGATGCTCTGATCGGCGTGAACGCCAAATTTGCCGAAGAATATAG TTTCTTCAACAACCTGAAAAAATCGCCGACGAACCTGCGGCTGATCAAGAGCTTTG CTAGAATGGGAGAACCCGTGGCTGACGCCAGAAAGAGCCATGTATATCGACGCAAT TCGATCCTGGGCACCGATCTCTCCGACGACGAGCTGAAGGCCCTGGCTGATTCTT TTAGCCTGGACGAGAACGGCAATAAGCTGGGGAAGGGCAAGCACGGCATGAGAA ACTTCATCATTAACAACGTGATAACAAATAAGAGATTCCACTACCTGATCCGGTAC GGCAACCCAGTCCACCTGCATGAGATCGCCAAGAATGAAGCCGTGGTCAAGTTTG TGCTGGGAAGAAATCGCCGATATCCAGAAGAAACAGGGCCAGAACGGCAAGAAC AGATCGATAGATACTACGAGACATGCATCGGCAAGGACTCTTCTAAAAAGCGTGGC CGAGAAGGTGAACGCCCTGACCAAGATCATCAGGCATGAACATACGACCAAGTTC GACAGCAGACGGAACTGATCGAAAAACCCGGCGCCGGCAACGCCGAGAGAGAA AAGTACAAGAAGATCATCAGCCTGTACCTGACAGTGAATCAACATCTCTGAAGA ACATTGTAAATATCAACTCAAGATACGTGATCGGATTTCACTGCGTGGAGAGAGAT GCCCCAGCTGTATAAGGAAAAGGGCTACGACATTAATCTGAAAAAGCTGAAAGACA AGGGATTACAAAGCGTGACCAAGCTGTGCGCCGGAATCGACGAGGAATGCAAGGA CGCTGAAAAAGGAATGACCGAGCGGGCCAAAGGCCCTTTTCGCTGCCCTGGAAACC GCCAACCCCAAGCTGTACGCCACATACATCAACTACTCTGATGAAGAGAAGAATG CCGAACCTGAGAAAGCAGATCAATAGAGAGAAAGGCCAAAAACCGCCCTGAACGCTC ATCTGCGCAACACCAAGTGGAACGTGATCATCCGGGAAGATCTTCTGAGAAGAGA TAACAAAGGCTGTGAAAATCTTCAGAAAATAAGGTGCGCCACCTGGAGGCCATCGA TACGCTCACCTGTACATCAACGACATCGCTGAGGTGAATAGCTATTTTCAGTTTTC CCACTACATCATGCAGCGGAGGATCATGGCCGAACGGTACGACAAGAGCAGCGGC AAGGTTAGAGAATACTTCGACCGCTGAACAATGAGAAAAAATACAACGATAGAC TGCTGAAGCTCCTCTGTGTGCCATTTCGGCTACTGCATCCCTAGATTCAAGAATCTG AGCATCGAGGCCCTGTTTCGACATGAACGAGGCCGTGAAGTTTGATAAGGAAAAGA AG (配列番号 530)
リンカー	GGATCC (配列番号 531)
SV40 NLS	CCCAAAAAAAAAAGGAAGGTG (配列番号 532)
SV-40 ポリA	AACTTGTATTATTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCATTCAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA TGTATCTTA (配列番号 533)

【0579】

一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物を含む AAV ベクターは、5' から 3' へ：ヒト U6 プロモーター、cas13d gRNA (この場合の gRNA は、ダイレクトリピート配列および CUG 標的化スパーサー配列を含む)、EFS プロモーター、コザック配列、Cas13d をコードする配列、リンカー配列、SV40 NLS 配列、および SV40 ポリA 配列を含む。一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物をコードする核酸は、配列番号 534 で示される。一部の実施形態では、CUG 標的化 Cas13d 組成物は、表 5 に描示されるように配列される。

【0580】

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表5:AAVユニタリーベクターにパッケージングするための CUG 標的化Cas13d組成物

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
ヒト U6 プロモーター	GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG AGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACG TGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAA AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATA TATCTTGTGGAAAAGGACGAAACACC (配列番号 519)
Seq179 ダイレクトリピート (DR)	Actatagccctgccggaatgacagggttctacaac (配列番号 180)
スパーサー(CTG ガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)
EFS プロモーター	TAGGTCTTGAAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGATCCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT TCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG (配列番号 520)
コザック配列	gcgcgccaccATG (配列番号 529)
Cas 13d Seq179	GCCAAAAAGAAGAAAAACGGCTCGCCAACTGAGAGAAGAAATGCAACAAACAGCGG AAACAGGCCATTCAAGAACAAAGAACAGAGACAAGAGAAAAGCCGCCCGCCCT CGCGAGACAGCCGCCCCCGAACAGCTGCTGCCGCTCTGTGCCAAAAGCGGCAAA GAAAATCTCTGGCCAAAAGCCGCCGGAAGTGAAGTCCAACTTCATCTTGGACCCACA GAGAAGAACAACAGTGATGACAGCTTTTGGCCAGGGCAGCACCGCCATCCTGGAG AAGCAGATCGTGGACAGAGCCATCAGCGACCTGCAGCCGGTTCAGCAGTTCCAAAG TGGAACCTGCCAGTGCCGCCAAGTACAGGCTGAAGAATAGCCGGGTGAGATTCCC CAACGTGACAGCTGACGATCCTCTGTATAGACGGAAGGATGGCGGCTTCGTGCCT GGCATGGACGCCCTCAGAAGAAAGAACGTACTGGAACAGAGATTCTTCGGCAAGT CTTTCGCGGATAACATCCACATCCAGATGATCTACAGCATCCTGGACATCCACAAG ATCTCTGCTGCCGCGAGCGGGCCACATCGTGACCTGCTCAATATCGTGAATGCGCTC AAAAGATAGAGACTTCATCGGCATGCTGGCCGCCACGCTGCTGTACAATGAGCTG AACGAGGAGGCCAAGCGGAGCATCGCCGACTTTTGCAAGAGTCCCAGACTGATCT ACTACTCTGCTGCTTTCTACGAGACATTGGACAAACGGCAAGAGCGAGCGACGGTCT AACGAGGACATCTTCAACATCCTGGCCCTGATGACCTGTCTGAGAAATTTACAGCAG CCACCACAGCATCGCCATCAAGGTGAAGGACTACAGCGCCGCTGGCCTGTACAAC CTGCCGAGACTGGGACCTGACATGAAGAAAATGCTGGACACCTTCTACACCGAGG CCTTCATCCAGCTTAACCAGAGCTTCCAGGACCACAACACCACAACCTGACATGT CTGTTTCGATATCCTGAACATCTCTGATAGCGCCAGACAGAAGCAGCTGGCTGAGG AATTTTATAGATACGTGGTGTTCAGGAACAAAAGAACTTGGGATTCTCCGTGCCG AAGCTGAGAGAGGAAATGCTGCTGCTGCCAGACGCTGCCGTGATCGCCGATAAGC GGTACGACACCTGCAGATCCAAGCTGTACAACCTGATGGACTTCTGATCCTGAGA GTGTACAGAACCGGCAGAGCCGACAGATGCGACAAGCTGCCTGAGGCCCTGCGGG CCGCCCTGACCGACGAGGAAAAGGCCGTGGTGTACCAACAAAAGAACCCCTGAGCCT GTGGAACGAGATGAGAACCCTGATCCTCGACGGCCTGCTGCCTCAGATGACACCT GAGAACCCTGAGCAGACTGTCCGGTCAAGAAAAGAAAGGGCGAACTGTCTCTGGATG ACGCCATGCTGAAAGAGTGCCTGTACGAGCCCGGACCTGTGCCCGAGGATGCTGC CCCTGAGGAAGCCAACGCCGAGTACTTCTGCCGGATGATCTACCTGGCCACCCTGT TTATGGATGGCAAGGAGATCAACACCCTGCTGACCACCCTGATTAGCAAAATTCGA GAACATCGCCGCCCTTCTGACAGACCATGGAACAGCTGAACATCGAGGCCGAGCTG GGCCCTGAATACGCCATGTTTACCAGAAGCAGAGCCGTAGCCGAGCAGCTGAGAG TGATCAACAGCTTCGCCCTGATGAAGAAGCCTCAGGTGAATGCCAAGCAGCAGCT

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

	GTACAGAGCCGCTGTCACCCCTGCTGGGAACAGAGGACCCCTGACGGCGTGACCGAT GAGATGCTGTGCATCGACCCCGTGACCGCAAGATGCTGCCTCCTAACACAGAGGC ATCATGGCGACACCGGCTTACGGAACCTTCATCGCAAACAACGTGGTGGAAAGCCG GAGATTCCAGTACTTAATCCGGTACAGCGATCCTGCTCAGCTGCACACAGCTCGCCA GCAACAAGAAGCTGGTCAGATTCGTGCTGAGCAGCATCCCCGACACACAGATCAA CAGATACTATGAAAACCTGTGGCCAGACCAAGACTGGCCGGCAGAGCCGCCAAGGTG GAATTCCTGACAGACATGATTGCCGCCATCAGATTCGACCAGTTTCGGGATGTCAA TCAGAAAAGAGCGCGGGGCCAATACTCAGAAAAGAAAGATATAAGGCCATGCTTGGC CTGTACCAGACCGTGCTGTACCTGGCTGTTAAAAATCTGGTGAACATTAACGCCAG ATACGTGATGGCCTTCCACTGCGTGGAGCGGGATATGTTTCTGTATGACGGCGAGC TGACAGATCCCAAGGGCGAGAGCGTGTCTGCTTTCTGGCTGTGAATGGAAAGAA GGGCGTGCAAGCCTCAGTACCTGTCTGCTGACCCAGCTGTTATCCGGCGGGATTACC TTAAGCGGAGTGCATGCGAGCAGATCCAGCACAACATGGAAAAACATCTCCGACCG GCTGCTGCGGGAATACCGGAACGCCGTGCGCCACCTGAATGTGATAGCCCATCTG GCTGACTACTCTGCCGACATGAGAGAAATCACCAGCTACTACGGCTTGATCACTA CCTGATGCAGAGACACCTCTTCAAAAAGACACGCCCTGGCAGATCAGACAGCCTGAA AGGCCAACTGAGGAGGAACAGAAGCTCATCGAGCAGGAGCAGAAGCAGCTGGCC TGGGAGAAGGCCCTGTTTGACAAGACCCCTGCAGTACCACAGCTACAACAAGGACC TGGTGAAGGCTCTTAACGCCCCCTTCGGATACAACCTGGCAAGATACAAGAACCT GTCTATCGAGCCTCTGTTTCAGCAAAAGAACGCCGCTCCTGCCGCCGAGATCAAGGCCA CACACGCC (配列番号535)
リンカー	GGATCC (配列番号531)
SV40 NLS	CCCCAAAAAAAAAGGAAGGTG (配列番号532)
SV-40ポリA	AACTTGTATTATTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTCCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAA TGTATCTTA (配列番号533)

10

20

【0581】

一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物を含むAAVベクターは、5'から3'へ：ヒトU6プロモーター、cas13d gRNA（この場合のgRNAは、ダイレトリビート配列およびCUG標的化スパーサー配列を含む）、EFSプロモーター、コザック配列、Cas13dをコードする配列、リンカー配列、SV40 NLS配列、およびSV40ポリA配列を含む。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物をコードする核酸は、配列番号536で示される。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物は、表6に描示されるように配列される。

【0582】

【表 6 - 1】

30

表6: AAVユニタリーベクターにパッケージングするためのCUG標的化Cas13d組成物

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
ヒトU6プロモーター	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG AGAGATAATTAGAAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACG TGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATATGTTTTAA AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATA TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号519)
Seq42ダイレトリビート (DR)	GACCAACACCTCTGCAAAACTGCAGGGGTCTAAAAC (配列番号537)
スパーサー(CTGガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号459)
EFSプロモーター	TAGGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGATCCGGTGC CTAGAGAAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAGTAGTCGCCGTGAACGT TCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGG (配列番号520)
コザック配列	gccgccaccATG (配列番号529)

40

50

【表 6 - 2】

Cas13d Seq42	AACAAATAAGAGAAAGACAAAGGCCAAGGCCGCTGGACTGAAGAGCGTCTTTTTTG ATCAGAAGCAAGCCGTGCTGACACATTTCGCCAAGGGCAACAACTCCCAGATCGA GAAGAAAGTGGTCAACAGCGAGGTCAAAGATCTGAGACAGCCTCCCGCCTTTGAT CTGGAACCTGAAGGAGAAAGACCTTCTATATCTCCGGCAAGAACAACATTAACACAT CTAGGGAGAACCCCTCTGGCTAGCGCTTCTCTGCCTCTCTCCAAGAGGCCAAAGGATT AGAGCCGAGAGGATCAAGAGAGCTAGAGAAGAAAATAGACCCTACCATAATGTG AAGAGGGTGGGAGAGGACGATCTGAGAGCCAAGGCTGACCTCGAGAAACACTAC TTCGGCAAGGAGTACAGCGATAATCTGAAAAATTCAGATTATTTATAATATCTCTGA CATCAACAAAATCATCAGCCCCATATCAATGACATCGTCTACTCCATGAACAATC TGGCTAGAAAACGACGAGTATATCGATGGAAAAATCGACGTGATCGGCTCCCTCTC CTCCACCACAGACTACTCTCTCTCATGAGCCCCAACAAAGGATCTGGAAAAGGAA AAAAAAGTTTCTCTCCATAGAGAAAACTACAAAAAATTCGTCGAGGCCAGCAAGC CCTACATGAGGTACTATGGAAAGGTGTTTATTAGAGACGTGAAGAAAAGCAAGCT CTCCACCGGAAAAGGGCGAGAAAGATTGAGGTGATGTATAGATCCGACGAGGAAATT TTCACCATTTTTCAAATTCTGAGCTATGTGAGACAATCCATCATGCACAACGACAT CGGAAACAAGAGCAGCATTCTGGCCATCGAAAAGTACCCCGCCAGATTCTGTCGGC TTCTGAGCGACCTCTCAAAAACCAAGACAAACGATGTCAATAGAAATGTTTCATTGA CAATAACAGCCAAACAACTTCTGGGTGCTCTTCAGCATCTTCGGAATGCAAGATC ACACCAGCGGAGCCGACAAAGATCTGTAGAAAATTTCTACGACTTCGTGATCAAGGC CGACAGCAAAAAACCTCGGATTCTCCCTCAAGAAAGATCAGAGAGCTGATGCTCGAT CTGCCAAGCGCAACATGCTGAGAGATCACCAAATTCGATACCGTGAGGAGCAAGT TTTATACCTCTCGACTTCATTATCTATCAACACTATCTCGAGGAGAAAGTCCAGA ATCGACAACATGGTGGAGAAAGCTGAGGATGACCCCTCAAGGAAAGAGGAAAAAGGAA GTGCTCTACGCTGCCGAGGCCAAGATTGTGTGGAATGCCATCGGAGCCAAAGGTCA TCAACAAGCTCGTGCCCATGATGAATGGCGATGCTCTGAAGGAGATCAAGAGAAA AAATAGAGATAGAAAAGCTCCCTCAGAGCGTGATCGCCACAGTGCAAGTGAATTC GACGCCAATGTGTTCTCCGGACTGATCTACTTTCTGACACTGTTTCTCGACGGCAA GGAGATCAACGAGATGGTGAAGCAACCTCATCAACCAAGTTTCGAGAACATTGACTCT CTGCTGCATGTCGATAGAGAAAATCTACAAGTCCGACGAGAAAGGATCTGGATCTCG AGATCGAGAAAGCTGGCCCTCTTTTCAAGGGCGTGGTGAGGCCAATAGCCAAGAC AGATACCGGCGCCGGAGAGATCTCCAAGAGCTTCTCCATCTTCCAGAGCGCCGAA AGGATTATCGAGGAACTGAAGTTTCAATTAAGAAGCTCACAAGAATGGATAACGAGA TTTCTCTAGCGAGGGCGTGTCTCTGATGCCGCTAACGTGCTCGGCGCTCAGAGGC GATGACTTTGACTTTAGCAATGAGTTTGTCTGGAGACGATCTGCACAGCGACGCTAA TAAGAAGATTATTAACAAGATCAATGGCACCAAGGAGGACAGAAATCTGAGGAAC TTATTATTAAATACGTCGTGAAGAGCAGAAAGGTTTCAGTATATCGCTAGACACAT GAATACACACTACGTCAAGCAGCTCGCCAATAACGAGACACTGAATAGATTCTGTG CTGAACAAGATGGGAGACGCCAAGATCATCAATAGGTACTACGAGTCCATCTCCG GCAATACCCCAATATTGAGGTGAGAAAGCCAAATCGACTACCTCGTCAAGAGACT GAGGAGCTTCAGCTTCGAAGACCTCAACGACGTCAAGCAAAAAGGTGAGACCCGGC ACCAATGAGAGCATCGAGAAAGGAGAAAGAAAAAGGCCCTCGTCGGACTGTGCCTCA CAATTCAGTACCTCGTGATAAAAAATCTGGTGAATATCAACGCTAGGTACACCACC GCTTCTACTGTCTGGAGAGGGACTCCAAACTGAAAGGCTTTGGCGTGGACGTGTG GAGAGATTTGAAATCCTACACCGCTCTGACCAATCACTTTATCAAAGAAGGCTATC TGCCCGTGAGAAAAGGCTGAAATTTCTGAGGGCCAATCTGAAGCATCTGGACTGTGA AGACGGCTTCAAATATTACAGAAACCAAGTGACCCACCTCAACGCCATTAGAGTC GCCTATAAATATATCAACGAGATTAAATCCGTGCACAGCTACTTCGCCCTCTACCA CTACATCATGCAGAGACATCTGTACGACAGCCTCCAAGCCAAAGCTAAGGACTCC TCCGGCTTCGTGATCGACGCTCTGAAGAAATCCTTCGAGCACAAGATCTACAGCAA AGATCTGCTCCACGTGCTGCACTCCCCCTTCGGCTATAATACCGCTAGATATAAAA ATCTGAGCATCGAGGCCCTCTTCGACAAGAACGAATCCAGACCCGAGGTGAATCC CCTCTCCACCAATGAT (配列番号538)
リンカー	GGATCC (配列番号531)
SV40 NLS	CCCAAAAAAAAAAGGAAGGTG (配列番号532)
SV-40 ポリA	AACTTGTATTATGACGTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA TGTATCTTA (配列番号533)

10

20

30

40

【0583】

【0584】

一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物を含むAAVベクターは、5'から3'へ：ヒトU6プロモーター、cas13d gRNA（この場合のgRNAは、ダイレクトリピート配列およびCUG標的化スパーサー配列を含む）、EFSプロモーター、コザック配列、Cas13dをコードする配列、リンカー配列、SV40 NLS配列、およびSV40ポリA配列を含む。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物をコードする核酸は、配列番号539で示される。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13d組成物は、表7に描示されるように配列される。

50

【 0 5 8 5 】

【 表 7 - 1 】

表7: AAVユニタリーベクターにパッケージングするための CUG 標的化Cas13d組成物

プラスミドエレメント	アミノ酸配列
ヒト U6 プロモーター	GAGGGCCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAAGGCTGTTAG AGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAAGATATTAGTACAAAAATACG TGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAA AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATA TATCTTGTGGAAGGACGAAAACACC (配列番号 519)
Seq212 ダイレクトリポート	glacaatagccctgcaglaaggcagggttctaAGAC (配列番号 213)
スパーサー(CTGガイド3)	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA (配列番号 459)
EFS プロモーター	TAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCA CATCGCCACACAGTCCCGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCCGCAATTGATCCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT TCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG (配列番号 520)
コザック配列	gccgccaccATG (配列番号 529)
Cas13d Seq212	AAAGAAGAAGCACCAGAGCGCCGCCGAGAAAGAGGCAAGTGAAAGAAGCTCAAGAAT CAAGAGAAGGCCCGAGAAGTACGCTAGCGAGCCCTTCCCCCTCCAGAGCGATACAG CTGGCGTGGAATGCTCCCGAAGAAAGACAGTCGTCAGCCACATTGCCAGCTCCAA GACACTGGCCAAGGCTATGGGACTCAAATCCACACTGGTCATGGGCGACAAGCTG GTCATCACCAGCTTTGCTGCTAGCAAGGCTGTCGGAGGCGCTGGCTACAAAAAGCG CTAACATTGAAAAAATCACAGATCTGCAAGGAAGGGTCATTGAGGAGCACGAAAG GATGTTTTAGCGCCGATGTCGGAGAGAAAAAATATCGAACTGAGCAAGAATGACTGC CACACCAACGTCACAAACCCCGTGGTGACCAACATCGGAAAGGATTACATCGGAC TGAAATCTAGGCTGGAGCAAGAGTTTTTCGGCAAGACATTCGAGAATGACAATCT GCATGTGCAGCTGGCTACAATATCCTCGACATCAAGAAAAATTTCTGGGAACCTATG TGAACAATATCATTTATATCTTCTACAATCTGAATAGGGCTGGCACCGGCAGAGAT GAGAGGATGTATGACGACCTCATCGGCACACTGTACGCTTACAAACCCATGGAGG CTCAACAGACCTATCTGCTCAAAGGCGACAAGGATATGAGGAGGTTTGAGGAGGT GAAACAGCTGCTGCAAAACACCTCCGCTTACTATGTGTATTACGGCACACTGTTCTG AGAAGGTGAAGGCTAAGAGCAAGAAGGAACAGAGGGCTAAGGAGGGCCGAAATCG ACGCTTGTACCGCCCATAACTACGATGTGCTGAGACTGCTGTCCCTCATGAGGCAG CTGTGCATGCACTCCGTCGCTGGAACAGCCTTTAAGCTGGCTGAGTCCGCTCTGTT CAACATTGAGGATGTGCTCAGCGCCGATCTGAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTTCT CCGGCGCCGTGAACAAAGCTCAATGACGGATTCTGTCAGCACTCCGGCAACCAATCT GTACGTGCTCCAGCAGCTGTACCCTAATGAGACCATCGAGAGAAATCGCCGAGAAAG TACTACAGACTCACCCTGAGGAAGGAGGATCTGAACATGGGAGTCAACATTAAAA AGCTGAGGGAGCTGATCGTGGGCCAATACTTTCCCGAGGTCTCGACAAAGAATA CGACCTCTCCAAGAATGGAGACAGCGTGGTGACATACAGAAGCAAGATTTATACC GTGATGAATTACATTCTGCTGTATTACCTCGAGGACCACGACTCCAGCAGAGAAAG CATGGTCGAAGCTCTGAGACAAAAACAGAGAGGGCGATGAAGGCAAGGAGGAGAT CTATAGACAGTTTGCCAAGAAGGTGTGGAACGGCGTGTCCGGACTGTTTGGCGTGT GTCTGAACCTCTTCAAGACCGAAAAAGAGAAACAAAGTTTAGGAGCAAAAGTCGCCCT CCCCGATGTGTCCGGCGCTGCCTATATGCTCTCCTCCGAGAACATCGACTACTTTGT CAAGATGCTCTTCTTTGTGTGTAAGTTTCTGGATGGCAAAAGAAATCAACGAGCTGC TGTGCGCTCTGATCAACAAATTTGATAAATTTGCCGATATTCTGGATGCTGCCGCT CAATGTGGCTCTTCCGCTCTGGTTCGTGGACAGCTATAGGTTCTTCGAGAGATCTAG GAGGATTAGCGCCAGATTAGAATCGTGAAGAACATCGCTTCCAAGGATTTTAAG AAATCCAAGAAGGATTCCGATGAGAGCTACCCCGAGCAGCTGTATCTGGATGCTC TGGCTCTGCTCGGAGACGTCATCTCCAAGTACAAGCAGAATAGAGATGGCAGCGT CGTCATCGATGACCAAGGCAATGCCGTGCTGACAGAGCAATACAAGAGGTTTAGA TATGAATTTTTCGAGGAGATCAAGAGGGACGAAAGCGCGGCATCAAGTACAAGA AGTCCGGAAAAACCCGAGTACAACCATCAGAGAAGGAATTTTATTCTGAATAATGT GCTGAAAAGCAAAATGGTTTTTCTATGTGGTGAAAGTACAATAGGCCAGCAGCTGC AGAGAACTGATGAAGAATAAGGAAATTTCTGAGGTTCTGTGCTGAGAGACATCCCCG

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

	ACTCCCAAGTGAGAAGATACTTTAAGGCCGTCCAAGGAGAGGAAGCTTACGCTAG CGCCGAAGCTATGAGGACAAAGACTGGTCGACGCTCTGTCCCAATTTAGCGTCACA GCTTGTCTGGATGAAGTGGGCGGCATGACAGACAAGGAATTCGCCTCCAGAGGG CCGTCGATAGCAAAAGAAAACTGAGAGCCATCATCAGACTGTATCTGACAGTCGC CTATCTGATTACCAAGAGCATGGTGAAGGTGAATACAAGGTTTAGCATTGCCTTTA GCGTGCTGGAGAGGGACTACTATCTGCTCATTGACGGCAAGAAGAAATCCAGCGA CTACACCGGAGAGGATATGCTGGCTCTGACCAGAAAATTTGTGGCGAAGATGCT GGACTGTATAGAGAGTGGAAAAGAGAAGACGCTGAAGCCAAGGACAAATATTTTG ACAAGGCCGAAAGGAAGAAGGTGCTGAGACAGAACGATAAGATGATCAGAAAGA TGCACTTCACACCCCACTCCCTCAATTACGTCCAAAAGAATCTCGAAAAGCGTCCAG AGCAACGGACTGGCCGCGTCATCAAGGAATATAGAAATGCCGTCGCTCACCTCA ATATCATCAATAGACTGGACGAGTACATTGGCTCCGCTAGGGCTGATAGCTACTAC TCTCTGTACTGTTACTGCCTCCAAATGTATCTGAGCAAGAACTTCAGCGTGGGCTA CCTCATCAACGTGCAAAAGCAGCTGGAGGAGCACCACCTACATGAAGGATCTC ATGTGGCTGCTCAACATCCCTTCGCTTACAACCTCGCCAGATACAAAATCTGTC CAACGAAAACTCTTTTACGACGAGGAAGCCGCCGCGAAAAGGCTGACAAGGCT GAGAACGAGAGAGGCGAA (配列番号540)
リンカー	GGAAGC (配列番号531)
SV40 NLS	CCCAAGAAGAAAAGGAAGGTC (配列番号532)
SV-40 ポリA	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT CACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAATCATCAA TGTATCTTA (配列番号533)

10

【0586】

一部の実施形態では、本開示のCUG標的化Cas13dタンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化された核酸配列である。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された配列は、ヒト対象において、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、翻訳の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも500%、または少なくとも1000%増加を示す。

20

【0587】

一部の態様では、配列番号518、528、534、536および539で提示されるものなどの、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、安定性の増大を示す。一部の態様では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、耐加水分解性の増大によって安定性の増大を示す。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された配列は、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、安定性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも500%、または少なくとも1000%増大を示す。一部の実施形態では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された配列は、ヒト対象において、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、耐加水分解性の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも500%、または少なくとも1000%増大を示す。

30

40

【0588】

一部の態様では、配列番号518、528、534、536および539で提示されるものなどの、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、ドナースプライス部位を含み得ない。一部の態様では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、約1つ、または約2つ、または約3つ、または約4つ、または約5つ、または約6つ、または約7つ、または約8つ、または約9つ、または約10以下のドナースプライス部位を含み得る。一部の態様では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、少なくとも1つ、または少なくとも2つ、または少なくとも3つ、または少なくと

50

も4つ、または少なくとも5つ、または少なくとも6つ、または少なくとも7つ、または少なくとも8つ、または少なくとも9つ、または少なくとも10少ない、ドナースプライス部位を含む。

【0589】

理論により拘束されることを望まないが、コドン最適化された核酸配列におけるドナースプライス部位の除去は、隠れたスプライシングが防止されるので、*in vivo*でCUG標的化Cas13dタンパク質の発現を予想外におよび予測不能に増加させることができる。さらに、隠れたスプライシングは、対象によって異なることがあり、これは、ドナースプライス部位を含むCUG標的化Cas13dタンパク質の発現レベルが、予測不能に対象によって異なることがあることを意味する。ヒトの治療に関して、このような予測不能性は受入れ難い。それに応じて、ドナースプライス部位を欠いている配列番号518、528、534、536および539で提示されるコドン最適化された核酸配列は、予想外におよび驚くべきことに、ヒト対象におけるCUG標的化Cas13dタンパク質の発現増加を可能にし、CUG標的化Cas13dタンパク質の発現をヒト対象の違いを超えて規則化する。

【0590】

一部の態様では、配列番号518、528、534、536および539で提示されるものなどの、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列のGC含量とは異なるGC含量を有し得る。一部の態様では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列のGC含量は、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、核酸配列全体にわたってより均一に分布している。

【0591】

理論により拘束されることを望まないが、核酸配列全体にわたってより均一にGC含量を分布させることによって、コドン最適化された核酸配列は、転写物長にわたってより均一な融解温度（「Tm」）を示す。融解温度の均一性は、ポリメラーゼおよび／またはリボソームがあまり失速せずに核酸配列の転写および／または翻訳が起こるので、ヒト対象におけるコドン最適化された核酸の発現増加を予想外にもたらす。

【0592】

一部の態様では、配列番号518、528、534、536および539で提示されるものなどの、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、より少ない抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有し得る。一部の態様では、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、コドン最適化されていない核酸配列、CUG標的化Cas13dタンパク質と比較して、少なくとも1つ、もしくは少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つ、もしくは少なくとも5つ、もしくは少なくとも6つ、もしくは少なくとも7つ、もしくは少なくとも8つ、もしくは少なくとも9つ、もしくは少なくとも10の、または少なくとも10少ない、抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有し得る。

【0593】

理論により拘束されることを望まないが、より少ない抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有することによって、CUG標的化Cas13dタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、ヒト対象において発現の増加を予想外に示す。

融合タンパク質

【0594】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、組成物は、(a)第1のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列またはその一部と、必要に応じて(b)第2のRNA結合性ポリペプチドをコードする配列とを含む標的RNA結合性融合タンパク質をコードする配列を含み、ここで、第1のRNA結合性ポリペプチドは、標的RNAに結合し、第2

のRNA結合性ポリペプチドは、RNAヌクレアーゼ活性を含む。

【0595】

一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質である。RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質は、RNA結合性ポリペプチドを標的RNAへガイドするgRNAに対応する少なくとも1つのRNA結合性ポリペプチドを含む。RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質としては、これだけに限定することなく、CRISPR/Casに基づくRNA結合性ポリペプチドまたはその一部であるRNA結合性ポリペプチドが挙げられる。

【0596】

シグナル配列

【0597】

一部の実施形態では、本開示の標的RNA結合性融合タンパク質は、シグナル配列を含む。一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、1つまたは複数のシグナル配列を含む。一部の実施形態では、シグナル配列は、核局在化配列(NLS)、核外輸送シグナル(NES)またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、シグナル配列は、1つまたは複数の核局在化配列(NLS)を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のNLS配列は、表8に収載される配列を含む。一部の実施形態では、NLSシグナル配列は、SV40 NLSシグナル配列である。一部の実施形態では、SV40 NLSシグナル配列は、PKKKRKV(配列番号437)である。

【0598】

【表8】

表8: 本開示の核局在化配列

名称	アミノ酸配列	配列番号
SV40-NLS	PKKKRKV	437
ヒトH2B-NLS	GKKRKRSRK	438
酵母H2B-NLS	GKKRSKV	439
ヒトp53-NLS	KRALPNNTSSSPQPKKKP	440
ヒト-cmyc-NLS	PAAKRVKLD	441
ヒトpRB-NLS	KRSAEGSNPPKPLKKLR	442
ヒトヌクレオプラスミン-NLS	KRPAATKKAGQAKKKKLDK	443
ヒトpRB-NLS(延長バージョン)	DRVLKRSAEGSNPPKPLKKLR	543

【0599】

一部の実施形態では、シグナル配列は、1つまたは複数のNES配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数のNES配列は、表9に収載される配列を含む。

【0600】

【表9】

表9: 本開示の核外輸送配列

名称	アミノ酸配列	配列番号
HIV REV NES	LPPLERLTLD	544
ヒトPKI NES	LALKLAGLDI	545

【0601】

一部の実施形態では、本開示の標的RNA結合性融合タンパク質は、タグ配列を含む。一部の実施形態では、タグ配列は、FLAGタグである。一部の実施形態では、FLAGタグ配列は、DYKDDDDK(配列番号436)である。

リンカー配列

【 0 6 0 2 】

一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、リンカー配列を含む。一部の実施形態では、リンカー配列は、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個またはその間の任意の数のアミノ酸を含み得るまたはそれからなり得る。一部の実施形態では、リンカー配列は、表10に収載されるリンカー配列を含む。

【 0 6 0 3 】

【表 1 0 - 1】

表10. 本開示のリンカー配列

リンカー配列 (アミノ酸)	配列番号
GGS	410
VDTANGS	411
VDTGNGS	412
SGSETPGTSESATPES	413
GGGGSGGGGS	414
GGGGSGGGGS	415
GGGGSGGGGS	416
GGS	417
EAAAKEAAAK	418
EAAAKEAAAKEAAAK	419
EAAAKEAAAKEAAAKEAAAK	420
APAPAPAP	421
APAPAPAPAPAP	422
APAPAPAPAPAPAPAPAP	423
GGGGSEAAAK	424
EAAAKGGGGS	425
GGGGSGGGGSEAAAKEAAAK	426
EAAAKEAAAKGGGGSGGGGS	427
RQTSPDPCPQLPLVPR	428
VDTGNWF	429
VDTANGSVDTGNGS	430
ARNVEERLCL	431
AIELNPSNA	432
ICGSRNL	433
VLATDMSKH	434
FLRELPEP	435
LIPKDQYYC	436
AEAAAKEAAAKA	620
AEAAAKEAAAKEAAAKA	621
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA	622
YVEFEGEQGVDEGGVSGGGGS	623
GSRNLDFQALEETTEYDGGY	624
ASSTSPVEISEWLDQKLTKS DRPEL	625
VNQCRQSEDSTFYLG	626
AVSPLLTTTNSSEGLSMGNY	627
LDEAYPGKKLLPDDPYEKACQ	628
SAAAATPAVRTVPQYKYAAGVRN	629
PQQHLNAQPQVTMQQPAVHVQ	630
GQEPL	631
GGGGSEAAAKGGGGGS	632
GGGGSEAAAKGGGGSEAAAKGGGS	633

10

20

30

40

50

【表 10-2】

GGGGSSGSETGGTSESATGESGG	632
GGG	
SGSETPGTSESATPES	633

プロモーター配列

【0604】

態様では、本開示のCUG標的化組成物は、プロモーター配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に開示されるいずれかのプロモーターを、本明細書に開示されるRNA標的化構築物に関して述べられる他のプロモーターのいずれかの代わりに用いることができる。一部の態様では、CUG標的化組成物は、短縮化CAG (tCAG) プロモーター (配列番号385) を含む。一部の態様では、CUG標的化組成物は、配列番号520に示される短いEF1-アルファ (EFS) プロモーターを含む。一部の態様では、CUG標的化組成物は、配列番号519で示されるようなヒトU6プロモーターを含む。一部の態様では、CUG標的化組成物は、配列番号609で示されるEFS-UBBプロモーターを含む。一部の態様では、CUG標的化組成物は、筋肉特異的プロモーターを含む。一部の態様では、CUG標的化組成物は、配列番号568 (全長)、配列番号608 (全長) または配列番号569 (短縮型) で示されるデスミンプロモーターである筋肉特異的プロモーターを含む。一部の態様では、CAG標的化組成物は、配列番号619で示されるシナプシンプロモーターを含む。一部の実施形態では、本開示のプロモーター配列は、ヒトEF1-アルファコアプロモーター (配列番号642) を含む。一部の実施形態では、本開示のプロモーター配列は、改変されたUBBイントロン (配列番号643) を含む。一部の実施形態では、本開示のプロモーター配列は、改変されたCMVエンハンサー配列 (配列番号644) を含む。一部の実施形態では、本開示のプロモーター配列は、eCMV-EFS-UBBプロモーター配列 (配列番号645) を含む。

【0605】

一部の実施形態では、プロモーターによる発現制御は、構成的または遍在性である。非限定的な例示的なプロモーターとしては、Pol IIIプロモーター、例えばU6およびH1プロモーターなど、ならびに／またはPol IIプロモーター、例えばSV40、CMV (必要に応じて、CMVエンハンサーを含む)、RSV (ラウス肉腫ウイルス) LTRプロモーター (必要に応じて、RSVエンハンサーを含む)、CBA (ハイブリッドCMVエンハンサー／ニワトリβ-アクチン)、CAG (ニワトリβ-アクチンと融合したハイブリッドCMVエンハンサー)、短縮化CAG、Cbh (ハイブリッドCBA)、EF-1a (ヒト伸長因子アルファ-1) またはEFS (短い、イントロン不含の、EF-1アルファ)、PGK (ホスホグリセロールキナーゼ)、CEF (ニワトリ胚線維芽細胞)、UBC (ユビキチンC)、GUSB (リソソーム酵素ベータグルクロニダーゼ)、UCOE (遍在性クロマチンオープニングエレメント)、hAAT (アルファ-1アンチトリプシン)、TBG (チロキシン結合性グロブリン)、デスミン (全長または短縮化)、MCK (筋クレアチンキナーゼ)、C5-12 (合成筋プロモーター)、CK8e (クリアチン (creatine) キナーゼ8)、NSE (ニューロン特異的エノラーゼ)、シナプシン、シナプシン-1 (SYN-1)、オプシン、PDGF (血小板由来増殖因子)、PDGF-A、MecP2 (メチルCpG結合性タンパク質2)、CaMKII (カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII)、mGluR2 (代謝型グルタミン酸受容体2)、NFL (ニューロフィラメント軽鎖)、NFH (ニューロフィラメント重鎖)、nβ2、PPE (ラットプレプロエンケファリン)、ENK (プレプロエンケファリン)、プレプロエンケファリン-ニューロフィラメントキメラプロモーター、EAAT2 (グルタミン酸輸送体)、GFAP (グリア細胞線維性酸性タンパク質)、MBP (ミエリン塩基性タンパク質)、ヒトロドプシンキナーゼプロモーター (hGRK1)、β-アクチンプロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、MHCK7 (筋クレアチンキナーゼおよびアルファミオシン重鎖遺伝子のエンハンサー／プロモーター

領域のハイブリッドプロモーター)、ならびにこれらの組合せが挙げられる。「エンハンサー」は、活性化タンパク質が結合して転写の尤度または頻度を増加させることができる、DNAの領域である。非限定的な例示的なエンハンサーおよび転写後調節エレメントとしては、CMVエンハンサー、MCKエンハンサー、HTLV-1のLTR内のR-U5'セグメント、SV40エンハンサー、ウサギβ-グロビンのエクソン2と3の間のイントロン配列、およびWPREが挙げられる。一部の実施形態では、イントロン、例えば、UBBイントロンは、プロモーター活性を増強するために使用される。一部の実施形態では、UBBイントロンは、EFSプロモーターとともに使用される。一部の実施形態では、エンハンサー配列を5'または3'UTR内に付加させることができる。一部の実施形態では、5'エンハンサーは、配列番号652:

10

【化1】

```
TAACGGCTAGCCTGAGGAGCTGCTGCGACAGTCCACTACCTTTTTTCGAGAGTGAC
TCCCGTTGTCCCAAGGCTTCCCAGAGCGAACCTGTGCGGCTGCAGGCACCGGCG
CGTCGAGTTTTCCGGCGTCCGGAAGGACCGAGCTCTTCTCGCGGATCCAGTGTTCC
GTTTCCAGCCCCCAATCTCAGAGCGGAGCCGACAGAGAGCAGGGAACCGGC
```

で示される、Hsp70であり得る。

ガイドされないRNA結合性融合タンパク質

【0606】

20

一部の実施形態では、標的RNA結合性融合タンパク質は、RNAによりガイドされる標的RNA結合性融合タンパク質ではなく、したがって、対応するgRNA配列を有さない標的RNAに結合することができる少なくとも1つのRNA結合性ポリペプチドを含む。そのようなガイドされないRNA結合性ポリペプチドとしては、限定することなく、PUF(PumilioおよびFBFホモロジーファミリー)タンパク質である少なくとも1つのRNA結合性タンパク質またはそのRNA結合性部分が挙げられる。この型のRNA結合性ポリペプチドを、CRISPR/CasなどのgRNAによりガイドされるRNA結合性タンパク質の代わりに使用することができる。mRNAの安定性および翻訳の媒介に関与するPUFタンパク質(Drosophila PumilioおよびC.elegans fem-3結合因子に由来する)の独特のRNA認識方式は当技術分野で周知である。同じく当技術分野で公知のヒトPumilio1のPUFドメインは同族RNA配列に密接に結合し、また、その特異性は改変することができる。ヒトPumilio1のPUFドメインは、8つの連続したRNA塩基を認識する8つのPUFモジュールを含有し、各モジュールが一塩基を認識する。各モジュール内の2つのアミノ酸側鎖は、対応する塩基のワトソン・クリック端を認識し、そのモジュールの特異性が決定されるので、PUFモジュールは、最大の8~16ntのRNAに特異的に結合するように設計することができる。Wang et al., Nat Methods. 2009; 6(11): 825-830。その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2012/068627も参照されたい。

30

【0607】

40

PUF-RNA相互作用のモジュール的性質は、PUFドメインの結合特異性を合理的に操作するために使用されている(Cheong, C. G. & Hall, T. M. (2006) PNAS 103: 13635-13639; Wang, X. et al (2002) Cell 110: 501-512)。しかし、アデニン、グアニンまたはウラシルを認識するモジュールを有するPUFドメインの設計の成功しか、上掲のWO2012/06827の教示より前に報告されていない。野生型PumH Dは、シトシン(C)に結合しないが、分子操作によって、Pumユニットの一部が良好な収率および特異性でCに結合するように変異され得ることが示されている。例えば、Dong, S. et al. Specific and modular binding code for cytosine recognition in Pumi

50

l i o / F B F (P U F) R N A - b i n d i n g d o m a i n s , T h e J o u r n a l o f b i o l o g i c a l c h e m i s t r y 286, 26732-26742 (2011)を参照されたい。したがって、PumHDは、RNAの任意の8塩基配列へのプログラム可能な結合を示す、WT Pumilioタンパク質の改変バージョンである。PumHDの8ユニットの各々は、4つ全てのRNA塩基に結合することができ、標的配列に隣接しているRNA塩基は、結合に影響を与えない。PUF設計の当技術分野において認知されているRNA結合規則については以下の参考文献も参照されたい：Filipovska A, Razif MF, Nygard KK, & Rackham O. A universal code for RNA recognition by PUF proteins. Nature chemical biology, 7 (7), 425-427 (2011); Filipovska A, & Rackham O. Modular recognition of nucleic acids by PUF, TALE and PPR proteins. Molecular BioSystems, 8 (3), 699-708 (2012); Abil Z, Denard CA, & Zhao H. Modular assembly of designer PUF proteins for specific post-transcriptional regulation of endogenous RNA. Journal of biological engineering, 8 (1), 7 (2014); Zhao Y, Mao M, Zhang W, Wang J, Li H, Yang Y, Wang Z, & Wu J. Expanding RNA binding specificity and affinity of engineered PUF domains. Nucleic Acids Research, 46 (9), 4771-4782 (2018); Shinoda K, Tsuji S, Futaki S, & Imanishi M. Nested PUF Proteins: Extending Target RNA Elements for Gene Regulation. ChemBioChem, 19 (2), 171-176 (2018); Koh Y Y, Wang Y, Qiu C, Opperman L, Gross L, Tanaka Hall TM, & Wickens M. Stacking Interactions in PUF-RNA Complexes. RNA, 17 (4), 718-727 (2011)。

10

20

30

40

50

【0608】

しかるが故に、ヒトPUM1 (1186個のアミノ酸) が、このタンパク質のC末端にRNA結合性ドメイン (RBD) (Pumilio相同ドメインPUM-HDアミノ酸828～アミノ酸1175としても公知) を含有すること、およびPUFがヒトPUM1のRBDに基づくことは、当技術分野において周知である。RNA結合のための36個のアミノ酸の8つのリピートモジュール (43個のアミノ酸を有するモジュール7を除く)、ならびにタンパク質の構造および安定性に重要なフランキングNまたはC末端領域がある。各モジュール内の、アミノ酸12、13および16は、RNA結合にとって重要であり、12および16がRNA塩基認識に関与する。アミノ酸13は、RNA塩基とスタックし、特異性および親和性を調整するために改変され得る。あるいは、PUF設計は、ヒトPUM1のネイティブな残基としてアミノ酸13を維持し得る。本明細書に開示されるPUF (CUG) またはPUMBY (CUG) 組成物の一部の実施形態では、アミノ酸13は (スタッキングのために)、Hで操作されることになり、他の実施形態では、Yで操作されることになる。一部の実施形態では、スタッキング残基は、結合および特異性を改善するために改変され得る。認識は、N末端からC末端へPUFが3'から5'へRNAを認識するのとは逆の配向で行われる。したがって、当技術分野において公知の8モジュール (8PUF) のPUF操作は、ヒトタンパク質を模倣する。例示的な8-mer RNA認識 (8PUF) は、次のように設計されることになる：R1'-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R8'。一実施形態では、8PUFは、RBDとして使用

される。別の実施形態では、8 PUF 設計のバリエーションが、14-mer RNA 認識 (14 PUF) RBD、15-mer RNA 認識 (15 PUF) RBD、または 16-mer RNA 認識 (16 PUF) RBD を作出するために使用される。別の実施形態では、PUF は、4-mer、5-mer、6-mer、7-mer、8-mer、9-mer、10-mer、11-mer、12-mer、13-mer、14-mer、15-mer、16-mer、24-mer、30-mer、36-mer、またはその間の任意の数のモジュールを含むように操作され得る。Shinoda et al., 2018; Criscuolo et al., 2020。野生型ヒト PUM1 のリピート 1~8 が、これをもって配列番号 462~469 でそれぞれ提供される。ヒト PUM1 からの PUF ドメインをコードする核酸配列は、配列番号 470 であり、ヒト PUM1 アミノ酸 828~1176 からの PUF ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 471 である。その全体が本明細書に組み込まれる、米国特許 9,580,714 も参照されたい。
【0609】

本開示のガイドされない RNA 結合性融合タンパク質の一部の実施形態では、融合タンパク質は、PUMBY (Pumilio に基づくアセンブリ) タンパク質である少なくとも 1 つの RNA 結合性タンパク質またはその RNA 結合性部分を含む。RNA を標的とするためネイティブな形態および改変された形態で広く使用されている RNA 結合性タンパク質 PumHD は、それぞれが 1 つの RNA 塩基を標的とする 4 つの標準的なタンパク質モジュールのセットをもたらすように設計したタンパク質構造に操作されている。これらのモジュール (すなわち、Pumilio に基づくアセンブリに関しては Pumbly) を、所望の標的 RNA に結合するように様々な組成および長さの鎖に連結される。本質的に、PUMBY は、PumHD の単一のタンパク質ユニットが連結されて任意のサイズおよび結合性配列特異性のアレイになる、より単純なモジュール形態の PumHD である。そのような Pumbly-RNA 相互作用の特異性は高く、Pumbly 鎖の、標的配列から 3 つまたはそれよりも多くのミスマッチを有する RNA 配列への結合は検出不可能である。Katarzyna et al., PNAS, 2016; 113 (19): E2579-E2588。その全体が参照により本明細書に組み込まれる US 2016/0238593 も参照されたい。
【0610】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第 1 の RNA 結合性タンパク質は、Pumilio および FBF (PUF) タンパク質を含む。一部の実施形態では、第 1 の RNA 結合性タンパク質は、Pumilio に基づくアセンブリ (PUMBY) タンパク質を含む。一部の実施形態では、PUF または PUMBY RNA 結合性タンパク質は、E17 などのヌクレアーゼドメインと融合している (配列番号 358)。別の実施形態では、単一のベクターは、E17 (配列番号 359) などの ZC3H12A からのヌクレアーゼドメインと融合した、dCas13d RNA 結合性の系を含む。
【0611】

本開示の組成物の一部の実施形態では、RNA 結合性タンパク質またはその RNA 結合性部分の少なくとも 1 つは、PPR タンパク質である。PPR タンパク質 (植物に由来するペントリコペプチドリピート (PPR) モチーフを有するタンパク質) は、核にコードされ、RNA レベルで、細胞小器官 (葉緑体およびミトコンドリア)、切り取り (cutting)、翻訳、スプライシング、RNA の編集、RNA 安定性に特異的に作用する遺伝子を排他的に制御する。PPR タンパク質は、一般には、35 アミノ酸のモチーフであり、PPR モチーフが約 10 個の連続したアミノ酸である構造を有する。PPR モチーフの組合せを RNA への配列選択的結合に使用することができる。PPR タンパク質は、多くの場合、約 10 リピートドメインの PPR モチーフで構成される。PPR ドメインまたは RNA 結合性ドメインは、触媒として不活性になるように構成することができる。その全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2013/058404。
【0612】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、少なくとも 2 つの RN

A 結合性ポリペプチド間のリンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーである。一部の実施形態では、リンカーは、VDTANGS（配列番号411）である。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、トリペプチドGGGの1つまたは複数のリピートを含む。他の実施形態では、リンカーは、非ペプチドリンカーである。一部の実施形態では、非ペプチドリンカーは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG）、c o -ポリ（エチレン／プロピレン）グリコール、ポリオキシエチレン（POE）、ポリウレタン、ポリホスファゼン、多糖、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルエチルエーテル、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリシアノアクリレート、脂質ポリマー、キチン、ヒアルロン酸、ヘパリン、またはアルキルリンカーを含む。

10

【0613】

一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、RNA結合活性のために多量体形成を必要としない。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、多量体複合体の単量体ではない。一部の実施形態では、多量体タンパク質複合体は、RNA結合性タンパク質を含まない。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、RNA分子内の標的配列に選択的に結合する。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、RNA分子内の第2の配列に対する親和性を含まない。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、RNA分子内の第2の配列に対して高い親和性を含まずそれに選択的に結合しない。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、終点を含めて、2アミノ酸から1300アミノ酸の間を含む。

20

【0614】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質の少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、核局在化シグナル（NLS）をコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核局在化シグナル（NLS）は、RNA結合性タンパク質のN末端に位置する。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、NLSをC末端に含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、第1のNLSをコードする第1の配列および第2のNLSをコードする第2の配列をさらに含む。一部の実施形態では、第1のNLSまたは第2のNLSは、RNA結合性タンパク質のN末端に位置する。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、第1のNLSまたは第2のNLSをC末端に含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNA結合性タンパク質は、NES（核外輸送シグナル）または他のペプチドタグまたは分泌シグナルをさらに含む。一部の実施形態では、タグは、FLAGタグである。

30

【0615】

一部の実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質は、第1のRNA結合性タンパク質として少なくとも1つのRNA結合性タンパク質を含み、それと共に、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる第2のRNA結合性タンパク質を含む。

【0616】

一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、第1のRNA結合性ポリペプチドのC末端において第1のRNA結合性ポリペプチドに対して作動可能に構成されている。一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、第1のRNA結合性ポリペプチドのN末端において第1のRNA結合性ポリペプチドに対して作動可能に構成されている。一実施形態では、例示的な融合タンパク質は、ZC3H12Aとして公知のジンクフィンガーエンドヌクレアーゼであるまたはその短縮化が配列番号358で示される第2のRNA結合性タンパク質（E17とも呼ばれる）と融合している、PUFまたはPUMBYに基づく第1のRNA結合性タンパク質である。

40

【0617】

UGCUGCUGCUGCUGC（配列番号454）を標的とする例示的な14-mer RNA認識（14PUMBY）は、アミノ酸配列：

50

【化 2】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHT
 QLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSK
 IVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGNVVIQHVLE
 HGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQY
 GSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGH
 TEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDK
 SKIVAEIRGHTQVLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIRH
 VLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQVLVQD
 QYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNQVLDG

10

(配列番号 547)

を含む。

【0618】

一部の態様では、配列番号 547 は、R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R8 - R8' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 547 は、表 11 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0619】

【表 11】

表 11: 配列番号 547 による 8PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCTECVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN DGPHS	510
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNQVLDG	496

30

【0620】

40

U G C U G C U G C U G C U G (配列番号 454) を標的とする例示的な 14-mer RNA 認識 (14PUMBY) は、アミノ酸配列:

50

【化 3】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHT
 QLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSK
 IVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGNYSYVIEHVLE
 HGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQY
 GSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGH
 TEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDK
 SKIVAEIRGHTQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIRH
 VLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQD
 QYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHIAITLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG
 (配列番号 547)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 547 は、R1' - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 -
 R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R8' に従って N 末端から C
 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 547 は、表 12 で詳細が
 明らかにされる配列で構成されている。

20

【0621】

【表 12】

表 12: 配列番号 547 による 14Pumby タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

40

【0622】

CUGCUGCUGCUGCUCU (配列番号 473) を標的とする例示的な 14-mer
 RNA 認識 (14PUMBY) は、アミノ酸配列:

50

10

20

30

40

50

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 477) を標的とする例示的な 14-mer RNA 認識 (14PUMBY) は、アミノ酸配列：

【化 5】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI
 RGHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGNVVIQHV
 LEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQ
 LVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPE
 DSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQY
 GSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIV
 AEIRGHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGSYVIE
 HVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGH
 TEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEH
 RPEDKSKIVAEIRGHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 558)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 558 は、R1' - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 -
 R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R6 - R8' に従って N 末端から C
 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 558 は、表 14 で詳細が
 明らかにされる配列で構成されている。

20

【0625】

【表 14】

表14: 配列番号558による14Pumbyタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

40

【0626】

【0627】

UGCUGCUG (配列番号 453) を標的とする例示的な 8-mer RNA 認識 (8 PUF) は、アミノ酸配列:

50

【化 6】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAAY
 QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNE
 MVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILE
 HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFA
 SNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYANYVVQKMIDVAEPGQR
 KIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 444 は、R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R8 - R8' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 444 は、表 15 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0628】

【表 15】

表15:配列番号444による8PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

20

30

【0629】

一部の実施形態では、本開示の PUF タンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化された核酸配列である。一部の実施形態では、PUF タンパク質をコードするコドン最適化された配列は、ヒト対象において、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、発現の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 100 %、少なくとも 200 %、少なくとも 300 %、少なくとも 500 %、または少なくとも 1000 % 増加を示す。一部の実施形態では、本開示の 8 PUF タンパク質は、配列番号 452 を含む核酸配列によりコードされる。一部の実施形態では、CUG 標的化 8 PUF と E17 ヌクレアーゼを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 460 を含む。一部の実施形態では、CUG 標的化融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、5' から 3' へ、flag タグ、SV-40 核局在化配列、8 PUF、および E17 ヌクレアーゼを含み、配列番号 515 で示される。一部の実施形態では、CUG 標的化融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、5' から 3' へ、SV-40 核局在化配列、8 PUF および E17 ヌクレアーゼを含み、配列番号 517 で示される。一部の実施形態では、CUG 標的化融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、5' から 3' へ、8 PUF、および E17 ヌクレアーゼを含み、配列番号 516 で示される。

40

【0630】

50

一部の実施形態では、本開示の P U F タンパク質をコードする核酸配列は、コドン最適化された核酸配列である。一部の実施形態では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された配列は、ヒト対象において、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、翻訳の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 100 %、少なくとも 200 %、少なくとも 300 %、少なくとも 500 %、または少なくとも 1000 % 増加を示す。

【0631】

一部の態様では、配列番号 452 および 515 ~ 517 で提示されるものなどの、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、安定性の増大を示す。一部の態様では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、耐加水分解性の増大によって安定性の増大を示す。一部の実施形態では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された配列は、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、安定性の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 100 %、少なくとも 200 %、少なくとも 300 %、少なくとも 500 %、または少なくとも 1000 % 増大を示す。一部の実施形態では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された配列は、ヒト対象において、野生型のまたはコドン最適化されていない核酸配列と比べて、耐加水分解性の少なくとも 5 %、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 100 %、少なくとも 200 %、少なくとも 300 %、少なくとも 500 %、または少なくとも 1000 % 増大を示す。

【0632】

一部の態様では、配列番号 452 および 515 ~ 517 で提示されるものなどの、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、ドナースプライス部位を含み得ない。一部の態様では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、約 1 つ、または約 2 つ、または約 3 つ、または約 4 つ、または約 5 つ、または約 6 つ、または約 7 つ、または約 8 つ、または約 9 つ、または約 10 以下のドナースプライス部位を含み得る。一部の態様では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、P U F タンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、少なくとも 1 つ、または少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または少なくとも 5 つ、または少なくとも 6 つ、または少なくとも 7 つ、または少なくとも 8 つ、または少なくとも 9 つ、または少なくとも 10 少ない、ドナースプライス部位を含む。

【0633】

理論により拘束されることを望まないが、コドン最適化された核酸配列におけるドナースプライス部位の除去は、隠れたスプライシングが防止されるので、*in vivo* で P U F タンパク質の発現を予想外におよび予測不能に増加させることができる。さらに、隠れたスプライシングは、対象によって異なることがあり、これは、ドナースプライス部位を含む P U F タンパク質の発現レベルが、予測不能に対象によって異なることがあることを意味する。ヒトの治療に関して、このような予測不能性は受入れ難い。それに応じて、ドナースプライス部位を欠いている配列番号 452 および 515 ~ 517 で提示されるコドン最適化された核酸配列は、予想外におよび驚くべきことに、ヒト対象における P U F タンパク質の発現増加を可能にし、P U F タンパク質の発現をヒト対象の違いを超えて規則化する。

【0634】

一部の態様では、配列番号 452 および 515 ~ 517 で提示されるものなどの、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、P U F タンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列の G C 含量とは異なる G C 含量を有し得る。一部の態様では、P U F タンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列の G C 含量は、P U F タンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、核酸配列全

体にわたってより均一に分布している。

【0635】

理論により拘束されることを望まないが、核酸配列全体にわたってより均一にGC含量を分布させることによって、コドン最適化された核酸配列は、転写物長にわたってより均一な融解温度（「T_m」）を示す。融解温度の均一性は、ポリメラーゼおよび／またはリボソームがあまり失速せずに核酸配列の転写および／または翻訳が起こるので、ヒト対象におけるコドン最適化された核酸の発現増加を予想外にもたらす。

【0636】

一部の態様では、配列番号452および515～517で提示されるものなどの、PUFタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、PUFタンパク質をコードするコドン最適化されていない核酸配列と比較して、より少ない抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有し得る。一部の態様では、PUFタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、コドン最適化されていない核酸配列、PUFタンパク質と比較して、少なくとも1つ、もしくは少なくとも2つ、もしくは少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つ、もしくは少なくとも5つ、もしくは少なくとも6つ、もしくは少なくとも7つ、もしくは少なくとも8つ、もしくは少なくとも9つ、もしくは少なくとも10の、または少なくとも10少ない、抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有し得る。

【0637】

理論により拘束されることを望まないが、より少ない抑制的マイクロRNA標的結合性部位を有することによって、PUFタンパク質をコードするコドン最適化された核酸配列は、ヒト対象において発現の増加を予想外に示す。

【0638】

【0639】

一部の実施形態では、8PUFタンパク質は、

【化7】

GGACGAAGCCGACTCTTGGAAGACTTCAGAAACAATCGGTATCCGAACCTTCAGCTGAGAGAAAT
TGCTGGTCACATCATGGAATTTTCTCAAGATCAACATGGAAGCCGGTTTATTGAACTTAAACTCGA
ACGAGCCACCCCGGCCGAAAGGCAATTGGTGTTCATGAAATTCTTCAGGCCGCATACCAACTCA
TGGTTGATGTTTTTGGGAACTATGTTATTCAAAAGTTTTTTGAGTTCGGGTCAGTGGAGCAAAAGTT
GGCATTGGCAGAGCGAATCCGGGGCCATGTTCTGAGCCTCGCTCTCCAAATGTACGGTAGTTATGT
CATTCGCAAAGCACTCGAGTTCATACCATCAGATCAACAGAATGAGATGGTGCGGGAGCTGGATG
GGCATGTTTTGAAATGCGTGAAAGACCAAAACGGTAGCTACGTAGTTGAGAAATGCATCGAATGC
GTCCAACCACAGTCTCTCCAATTTATTATAGATGCATTTAAGGGTCAGGTTTTTCGCGCTTTCTACGC
ACCCGTATGGGAACCGAGTGATTTCAGAGAATCTTGGAGCACTGCCTGCCGGATCAGACACTCCCT
ATCTTGGAGGAATTGCACCAGCATACCGAACAATTGGTGCAAGATCAATACGGTTCATATGTTATT
CGGCACGTTCTTGAGCATGGAAGGCCAGAGGACAAGTCAAAGATCGTCGCTGAGATTAGAGGTAA
CGTATTGGTGCTCTCACAACACAAATTTGCATCTAATGTGGTGGAGAAATGTGTTACTCATGCTTC
TAGAACGGAAAGGGCAGTTCTCATAGACGAAGTTTGACAATGAATGATGGTCCTCATAGCGCAC
TTTATACCATGATGAAGGACCAGTATGCAAACTATGTCGTCCAGAAAATGATCGATGTGGCGGAG
CCCGGTCAACGGAAAATCGTGATGCACAAAATCCGACCTCACATTGCTACACTCAGAAAATACAC
GTATGGAAAACATATTCTGGCTAAGCTGGAGAAATATTACATGAAGAATGGAGTGGATCTGGGG
(配列番号 452)

を含む核酸配列によってコードされ得る。

【0640】

UGCUGCUGCUGCUGC (配列番号454) を標的とする例示的な14-mer rRNA認識(14PUF)は、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 8】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAY
 QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNE
 MVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILE
 HCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIRLKLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG
 SYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHV
 LKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPI
 LEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGSYVIRHVLE
 HGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALY
 TMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGV
 DLG (配列番号 445)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 445 は、R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 -
 R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R6 - R7 - R8 - R8' に従って N 末端から C
 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 445 は、表 16 で詳細が
 明らかにされる配列で構成されている。

【0641】

【表 16 - 1】

20

表 16: 配列番号 445 による 14 PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR G	490

【表 16 - 2】

30

PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELD G	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
PUF R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELD G	505
PUF R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIR G	499
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVC TMNDGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKI RP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

40

【0642】

50

UGCUGCUGCUGCUG (配列番号 454) を標的とする例示的な 14-mer RNA 認識 (14PUF) は、アミノ酸配列:

【化 9】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEIL
QAAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFA
LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPED
KSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAAYQLMVDVFGN
YVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVREL
DGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFA
LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLS
QHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQK
MIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号
446)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 446 は、R1'-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R8' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 446 は、表 17 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0643】

【表 17】

表 17: 配列番号 446 による 14PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

40

【0644】

50

U G C U G C U G C U G C U G C (配列番号 4 5 5) を標的とする例示的な 1 5 - m e
r R N A 認 識 (1 5 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 1 0】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
FIPSDQQNEMVRELDGHVCLKCVKDQNGSYVVRKCIQCVQPQSLQFIIDAFKQGVFAL
STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQ
LVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSR
VIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVCLKCVKDQNGNHHVVQKCIQCVQPQSLQFIIDAF
KQGVFALSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLE
HGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG
PHSHTQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKC
VTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV
MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 447)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 4 4 7 は、 $R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R6 - R7 - R8 - R8'$ に従って N 末端
から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 4 7 は、表 1 8 で
詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0 6 4 5】

30

40

50

【表 18】

表18: 配列番号447による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
PUF R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	505
PUF R4	C	HVLKCVKQDQNGSYVVRKCIQVQPSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
PUF R4	U	HVLKCVKQDQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFKG	502
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ	513
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	508
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

【0646】

UGCUGCUGCUGCUGC (配列番号455) を標的とする例示的な15-me
r RNA認識(15PUF)は、アミノ酸配列:

30

【化11】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
FIPSDQQNEMVRELDGHVHLKCVKQDQNGSYVVRKCIQVQPSLQFIIDAFKGGQVFAL
STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDK
SKIVAEIRGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSY
VIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELD
GHVHLKCVKQDQNGSYVVRKCIQVQPSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIERILEH
CLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQ
HKFASVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSNVLVLSQHKFASNVVEKCVT
HASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVM
HKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号448)

40

を含む。一部の態様では、配列番号448は、R1'-R1-R2-R3-R4-R5-
R6-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R7-R8-R8'に従ってN末端
からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号448は、表19で

50

詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0647】

【表19】

表19:配列番号448による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
PUF R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	505
PUF R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	499
PUF R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
PUF R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	505
PUF R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	U	HTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	499
PUF R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN DGPHS	510
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN DGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

30

【0648】

UGCUGCUGCUGCUGC (配列番号455) を標的とする例示的な15-mer RNA認識(15PUF)は、アミノ酸配列:

【化13】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
QAAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
FIPSDQQNEMVRELDGHVHLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFAL
STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGYNYVIQHVLEHGRPEDK
SKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSHIMEF
SQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQ
KLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVHLKCVKDQN
GSYVVEKCECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEEL
HQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKC
VTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV
MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号461)

40

50

を含む。一部の態様では、配列番号461は、R1'－R1－R2－R3－R4－R5－R6－R7－R1－R2－R3－R4－R5－R6－R7－R8－R8'に従ってN末端からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号461は、表20で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0649】

【表20】

表20:配列番号461による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
PUF R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	505
PUF R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCTECVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	499
PUF R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	510
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCTECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

30

【0650】

UGCUGCUGCUGCUGCUCU（配列番号456）を標的とする例示的な16-mer RNA認識（16PUF）は、アミノ酸配列：

40

50

【化 1 4】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEI
LQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIQCVQPQSLQFIIDAFKQVFA
LSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQ
LVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSY
VIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIQCVQPQSLQFIIDAFK
GQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEH
GRPDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH
SALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHTEQLVQDQYGSYVIRHV
LEHGRPDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND
GPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILA
KLEKYYMKNGVDLG (配列番号 449)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 449 は、 $R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R8 - R6 - R7 - R8 - R8'$ に従って
N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 449 は、表
21 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0651】

30

40

50

【表 2 1】

表 21: 配列番号 449 による 16PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNGRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFSGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
PUF R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIIECVQPQSLQFIIDAFKG	502
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIIEHCLPDQTLPILEELHQ	513
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSGYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN DGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN DGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

30

【0 6 5 2】

U G C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 5 6) を標的とする例示的な 1 6 - m
e r RNA 認識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列:

40

50

【化 1 5】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEI
 LQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKAL
 EFIPSDQQNEMVRELDGHVCLKVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGVFA
 LSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPED
 KSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGS
 YVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVREL
 DGHVCLKVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGVFALSTHPYGSRVIRRIEL
 HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLS
 QHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRK
 MIDVAEPGQRKIVMHKIRPNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTM
 NDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKH
 ILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 450)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 450 は、R 1' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
 R 6 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 7 - R 8 - R 8' に従って
 N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 450 は、表
 22 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0 6 5 3】

【表 2 2 - 1】

表 22: 配列番号 450 による 16 PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
PUF R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	502
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQ	513
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
PUF R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	502
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQ	513
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500

30

40

50

【表 2 2 - 2】

PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	508
PUF R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

【0 6 5 4】

10

U G C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 5 6) を標的とする例示的な 1 6 - m e r R N A 認識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列:

【化 1 6】

GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQCVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQCVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 451)

20

30

を含む。一部の態様では、配列番号 4 5 1 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 5 1 は、表 2 3 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 5 5】

【表 2 3 - 1】

表 23: 配列番号 451 による 16 PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列番号
PUF R1'	-	GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
PUF R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIQCVQPQSLQFIIDAFKG	502
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500

40

50

【表 2 3 - 2】

PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	508
PUF R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
PUF R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	511
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	509
PUF R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 5 6】

C U G C U G C U (配列番号 4 7 2) を標的とする例示的な 8 - m e r R N A 認識 (8 P U F) は、アミノ酸配列:

20

【化 1 7】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 480)

30

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 0 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 0 は、表 2 4 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 5 7】

【表 2 4 - 1】

表 24: 配列番号 480 による 8PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQ	514
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501

40

50

【表 2 4 - 2】

PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
PUF R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

【0 6 5 8】

C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 7 3) を標的とする例示的な 1 4 - m e r
R N A 認 識 (1 4 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 1 8】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIQLKLERATPAERQLVFNEI
LQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKQGVFA
LSTHPYGSRVIRRILEHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQ
LVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSY
VIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFK
GQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEH
GRPEDKSKIVAEIRGHTQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQ
HKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKM
IDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号
481)

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 1 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C
末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 1 は、表 2 5 で詳細が
明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 5 9】

10

20

30

40

50

【表 2 5 - 1】

表25:配列番号481による14PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	U	HVLKCVKDDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCPDQTLPILEELHQ	514
PUF R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	501
PUF R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	509
PUF R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
PUF R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	504
PUF R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
PUF R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502

10

【表 2 5 - 2】

PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
PUF R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

20

【0 6 6 0】

C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 7 3) を標的とする例示的な 1 4 - m e r
RNA 認識 (1 4 P U F) は、アミノ酸配列:

30

【化 1 9】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEM
VRELDGHVHLKCVKDDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHL
CLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGN
RFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLS
SLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVHLKCVKDDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQ
FIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLE
HGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL
YTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNG
VDLG (配列番号 482)

40

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 2 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 6 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C
末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 2 は、表 2 6 で詳細が
明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 6 1】

50

【表 2 6 - 1】

表26:配列番号482による14PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	U	HVLKCVKDDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHCLPDQTLPILEELHQ	514
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
PUF R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
PUF R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
PUF R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
PUF R4	U	HVLKCVKDDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
PUF R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHCLPDQTLPILEELHQ	514
PUF R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501

10

20

【表 2 6 - 2】

PUF R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
PUF R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

【0 6 6 2】

C U G C U G C U G C U G C U G (配列番号 4 7 4) を標的とする例示的な 1 5 - m e
r R N A 認 識 (1 5 P U F) は、アミノ酸配列:

【化 2 0】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHVVLKCVKDDQNGSYVVEKCIIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILE
HCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG
SYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHV
LKCVDQNGSYVVRKCIIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPI
LEELHQHTEQLVQDQYGNYSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCV
THASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNV
LVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMI
DVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号483)

30

40

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 3 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端
から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 3 は、表 2 7 で
詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 6 3】

50

【表 27-1】

表27:配列番号483による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPIL EELHQ	512
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPIL EELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511

10

20

【表 27-2】

R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

【0664】

30

CUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号474) を標的とする例示的な15-mer RNA認識(15PUF)は、アミノ酸配列:

【化21】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHHVLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILE
HCLPDQTLPIL EELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGS
SRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHV
LSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHHVLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSL
QFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPIL EELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVL
EHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSNV
LVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMI
DVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号484)

40

を含む。一部の態様では、配列番号484は、R1'-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R7-R8-R8'に従ってN末端からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号484は、表28で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

50

【0665】

【表28-1】

表28:配列番号484による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502

10

20

【表28-2】

R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	510
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYMKNGVDLG	496

【0666】

CUGCUGCUGCUGCUGCUG (配列番号474)を標的とする例示的な15-mer RNA認識(15PUF)は、アミノ酸配列:

【化22】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHHVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILE
HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFA
SNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLV
FNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEF
IPSDQQNEMVRELDGHHVLKCVKDQNGNHVVQKIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYG
SRVIRRIHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVL
VLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMID
VAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYMKNGVDLG (配列番号485)

30

40

を含む。一部の態様では、配列番号485は、R1'-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R8'に従ってN末端からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号485は、表29で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

50

【 0 6 6 7 】

【表 2 9 - 1】

表29:配列番号485による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	510
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
R4	U	HVLKCVKDDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	503

10

20

【表 2 9 - 2】

R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ	514
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

【 0 6 6 8 】

C U G C U G C U G C U G C U G C (配列番号 4 7 5) を標的とする例示的な 1 6 - m
e r RNA 認識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列:

【化 2 3】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHHVLKCVKDDQNGSYVVRKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILE
HCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG
SYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHHV
LKCVDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPI
LEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVT
HASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPH
TEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTER
AVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYT
YGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号486)

40

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 6 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -

50

R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 6 は、表 3 0 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【 0 6 6 9 】

【表 3 0 - 1 】

表 30: 配列番号 486 による 16 PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA 認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
R4	U	HVLKCVKDDQNGNHVVQKCIKCVQPQSLQFIIDAFKG	503
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ	514

10

20

【表 3 0 - 2 】

R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

【 0 6 7 0 】

C U G C U G C U G C U G C U G C (配列番号 4 7 5) を標的とする例示的な 1 6 - m e r RNA 認識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列：

40

50

【化 2 4】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
 QAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
 FIPSDQQNEMVRELDGHVVKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFAL
 STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDK
 SKIVAEIRGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSY
 VIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELD
 GHVVKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEH
 CLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQ
 HKFASVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMI
 DVAEPGQRKIVMHKIRPNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND
 GPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILA
 KLEKYYMKNGVDLG (配列番号 487)

10

を含む。一部の態様では、配列番号 487 は、R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 -
 R6 - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R8 - R7 - R8 - R8' に従って
 N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 487 は、表
 31 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0671】

【表 31 - 1】

表31:配列番号487による16PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512

30

40

50

【表 3 1 - 2】

R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 7 2】

C U G C U G C U G C U G C U G C (配列番号 4 7 5) を標的とする例示的な 1 6 - m
e r RNA 認識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列:

20

【化 2 5】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHVVLKCVKDDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIERILE
HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKF
ASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQR
KIVMHKIRPHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKF
FEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVVLKCVKDD
QNGNHVVQKCIIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ
HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTE
RAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKY
TYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号 488)

30

を含む。一部の態様では、配列番号 4 8 8 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 6 - R 7 - R 8 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って
N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 4 8 8 は、表
3 2 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

40

【0 6 7 3】

【表 3 2 - 1】

表32:配列番号488による16PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAERIRG	490

50

【表 3 2 - 2】

R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	504
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	503
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ	514
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R8	C	ALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	494
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

【0 6 7 4】

G C U G C U G C (配列番号 4 7 6) を標的とする例示的な 8 - m e r R N A 認識 (8 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 2 6】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
FIPSDQQNEMVRELDGHVVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFAL
STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDK
SKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYT
MMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYM
KNGVDLG (配列番号 549)

30

を含む。一部の態様では、配列番号 5 4 9 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 4 9 は、表 3 3 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 7 5】

【表 3 3 - 1】

表33:配列番号549による 8PUF タンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506

40

50

【表 3 3 - 2】

R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGYVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 7 6】

G C U G C U G C U G C U G C (配列番号 4 7 7) を標的とする例示的な 1 4 - m e r R N A 認 識 (1 4 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 2 7】

GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGS RFIRLKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAEIRIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALE
FIPSDQQNEMVRELDGHV LKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFAL
STHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQ
LVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAEIRIRGHVLSLALQMYGSR
VIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHV LKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAF
KGQVFALSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLE
HGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQDQYGYVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVL
SQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEK
MIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号
550)

20

30

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 0 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 0 は、表 3 4 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 7 7】

【表 3 4 - 1】

表34:配列番号550による14PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGS RFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFEFGSLEQKLALAEIRIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAEIRIRG	492
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507

40

50

【表 3 4 - 2】

R4	U	HVLKCVKQDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	503
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRILEHCLPDQTLPILEELHQ	514
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 7 8】

GCUGCUGCUGCUGC（配列番号 4 7 7）を標的とする例示的な 1 4 - m e r
RNA 認識（1 4 P U F）は、アミノ酸配列：

【化 2 8】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAY
QLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNE
MVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILE
HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGS
SRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLS
SLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIQVQPQSLQ
FIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLE
HGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALY
TMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGV
DLG（配列番号 551）

20

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 1 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 6 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C
末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 1 は、表 3 5 で詳細が
明らかにされる配列で構成されている。

30

【0 6 7 9】

【表 3 5 - 1】

表35:配列番号551による14PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKQDQNGSYVVRKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506

40

50

【表 3 5 - 2】

R4	C	HVLKCVKQDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIRILEHCLPDQTLPIL EELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 8 0】

G C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 7 8) を標的とする例示的な 1 5 - m e
r R N A 認 識 (1 5 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 2 9】

GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEI
LQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFA
LSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPIL EELHQHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQ
LVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSY
VIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCI ECVQPQSLQFIIDAFK
GQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPIL EELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEH
GRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH
SHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCV
THASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVM
HKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号552)

20

30

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 2 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 -
R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端
から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 2 は、表 3 6 で
詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 8 1】

【表 3 6 - 1】

表36:配列番号552による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	U	HVLKCVKQDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRIRILEHCLPDQTLPIL EELHQ	513
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508

40

50

【表 3 6 - 2】

R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	54
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	502
R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	510
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	50
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 8 2】

G C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 7 8) を標的とする例示的な 1 5 - m e r R N A 認 識 (1 5 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 3 0】

GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEI
LQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFSGLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFAL
LSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPED
KSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGS
YVIRKFFEFSGLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVREL
DGHVLKCVKDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIE
HCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLS
QHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSNVLVLSQHKFASYVVRKC
VTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIV
MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号 553)

20

30

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 3 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 3 は、表 3 7 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 8 3】

【表 3 7 - 1】

表37:配列番号553による15PUFタンパク質

40

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	C	AAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFSGLEQKLALAERIRG	491
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQ	513

50

【表 3 7 - 2】

R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	497
R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	492
R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	507
R4	U	HVLKCVKQDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGG	503
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCPDQTLPILEELHQ	514
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	501
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	509
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

【0 6 8 4】

G C U G C U G C U G C U G C U (配列番号 4 7 8) を標的とする例示的な 1 5 - m e r RNA 認識 (1 5 P U F) は、アミノ酸配列:

20

【化 3 1】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVVKCVKQDQNGNHVVQKCIQVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHLCPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSHIMEFSQDQHGSRFIRLKLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVVKCVKQDQNGSYVVRKCIQVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIERILEHLCPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号 554)

30

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 4 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 4 は、表 3 8 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

40

【0 6 8 5】

【表 3 8 - 1】

表38:配列番号554による15PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	U	HIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	C	AAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491

50

【表 3 8 - 2】

R3	G	HVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	U	HVLKCVKDQNGNHVVQKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	C	QVFALSTHPYGSRVIRILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	G	HTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	U	NVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHS	509
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

【0 6 8 6】

G C U G C U G C U G C U G C U G (配列番号 4 7 9) を標的とする例示的な 1 6 - m e r R N A 認 識 (1 6 P U F) は、アミノ酸配列：

【化 3 2】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVULKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFA
LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAER
QLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGN
RVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVULKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAF
KGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLE
HGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGP
HSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHTEQLVQDQYGNVVIQH
VLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMN
DGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHIL
AKLEKYYMKNGVDLG(配列番号555)

30

40

を含む。一部の態様では、配列番号 5 5 5 は、R 1 ' - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - R 5 - R 6 - R 7 - R 8 - R 6 - R 7 - R 8 - R 8 ' に従って N 末端から C 末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号 5 5 5 は、表 3 9 で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0 6 8 7】

50

【表 3 9】

表39:配列番号555による16PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R1	C	HIMEFSQDQHGSRFIRLKLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYSYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
R6	U	HTEQLVQDQYGNYSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYSYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

10

20

【0688】

G C U G C U G C U G C U G C U G (配列番号479)を標的とする例示的な16-mer RNA認識(16PUF)は、アミノ酸配列:

30

【化33】

GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEIL
QAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKAL
EFIPSDQQNEMVRELDGHVCLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFA
LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPED
KSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGN
YVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVREL
DGHVCLKCVKDDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFA
LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLS
QHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQK
MIDVAEPGQRKIVMHKIRPNVLVLSQHKFASYSYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTM
NDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHI
LAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号556)

40

を含む。一部の態様では、配列番号556は、R1'-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8-R7-R8-R8'に従って

50

N末端からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号556は、表40で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

【0689】

【表40】

表40:配列番号556による16PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1 [*]	-	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKG	505
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	500
R1	G	HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	498
R2	U	AAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRG	490
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	508
R4	G	HVLKCVKDDQNGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKG	504
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	512
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRG	52
R7	G	NVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	510
R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8 [*]	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

【0690】

GCUGCUGCUGCUGCUG（配列番号479）を標的とする例示的な16-mer RNA認識（16PUF）は、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 3 4】

GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGS RFIELKLERATPAERQLVFNEIL
 QAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKAL
 EFIPSDQQNEMVRELDGHV LKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKGQVFA
 LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRP
 PEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYT
 MMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIMEFSQDQHGS RFIRLKLERATP
 AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM
 YGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHV LKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFI
 IDAFKGQVFA LSTHPYGS RVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQ
 HVLEHGRP PEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTM
 NDGPHSALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHI
 LAKLEKYYMKNGVDLG(配列番号557)

10

を含む。一部の態様では、配列番号557は、R1' - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 -
 R6 - R7 - R8 - R1 - R2 - R3 - R4 - R5 - R6 - R7 - R8 - R8' に従って
 N末端からC末端に進むアーキテクチャを含む。一部の態様では、配列番号557は、表
 41で詳細が明らかにされる配列で構成されている。

20

【0691】

【表 4 1】

表41:配列番号557による16PUFタンパク質

PUF モジュール	RNA認識	アミノ酸配列	配列 番号
PUF R1'	-	GRSRLLED FRNNRYPNLQLREIAG	495
R1	G	HIMEFSQDQHGS RFIELKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	U	AAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	C	HVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	G	HVLKCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	U	QVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	C	HTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRP PEDKSKIVAEIRG	500
R7	G	NVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	510
R8	U	ALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	493
R1	C	HIMEFSQDQHGS RFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ	499
R2	G	AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRG	491
R3	U	HVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDG	506
R4	C	HVLKCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKG	505
R5	G	QVFALSTHPYGS RVIERILEHCLPDQTLPILEELHQ	513
R6	U	HTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRP PEDKSKIVAEIRG	500
R7	C	NVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDG PHS	511
R8	G	ALYTMMKDQYASYVVEKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP	489
PUF R8'	-	HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG	496

30

40

50

【0692】

一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、配列番号444～451、461、480～488、547～558、570、または638～649によるPUFを含む。一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、配列番号444によるPUFを含む。一部の態様では、本開示の融合タンパク質は、N末端からC末端へ：ヒトNLS配列、配列番号444によるPUF、リンカー配列、およびエンドヌクレアーゼを含む。一部の態様では、本開示の例示的な8PUF標的化CUG融合タンパク質は、表42～50のいずれか1つに収載されているエレメントに従ってN末端からC末端へ配列されている。一部の実施形態では、本開示の8PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号559を含む。一部の実施形態では、本開示の14PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号560を含む。一部の実施形態では、本開示の14PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号561を含む。一部の実施形態では、本開示の15PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号562を含む。一部の実施形態では、本開示の15PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号563を含む。一部の実施形態では、本開示の15PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号567を含む。一部の実施形態では、本開示の16PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号565を含む。一部の実施形態では、本開示の16PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号566を含む。一部の実施形態では、本開示の16PUFタンパク質を含むCUG標的化融合タンパク質は、配列番号567を含む。

10

20

【0693】

【表42】

表42:例示的な8PUF標的化CUG融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
8PUF	UGCUGCUG	GRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRLFIE LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFF EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQP QSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIRILEHCLPDQTLPL ILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVA EIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVC TMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKI VMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 444)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGI VVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

30

40

【0694】

【表 4 3】

表43:例示的な14PUF標的化 CUG 融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
14PUF	UGCUGCUGCU GCUG	GRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFI ELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQK FFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALE FIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQCV QPQSLQFIIDAFKGGVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQ TLPILEELHQHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLV FNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAER IRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELD GHVLCVKDQNGSYVVRKCIQCVQPQSLQFIIDAFKGG VFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQL VQDQYGNYYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHTEQLVQ DQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHK FASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYT MMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATL RKYTYGKHILAKLEKYMKNGVDLG (配列番号 445)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIVVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

20

30

40

50

【 0 6 9 5 】

【表 4 4】

表44:例示的な14PUF標的化CUG融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
14PUF	UGCUGCUGCU GCUG	GRSRLLDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIE LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFF EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVVKCVKDQNGSYVVEKCIQVQPP SLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPI EELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQA AYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIRGHVLS ALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVVKCVK DQNGSYVVEKCIQVQPPSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPY GNRVIQRILEHCLPDQTLPIEELHQHTEQLVQDQYGSYV IRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLSQHKFASNVVEKC VTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQYAN YVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHIL AKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 446)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIIVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

20

30

40

50

【 0 6 9 6 】

【表 4 5】

表45:例示的な15PUF標的化 CUG 融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
15PUF	UGCUGCUGCU GCUGC	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIR LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFFE FGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPS DQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIECVQPS LQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILE ELHQHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEILQ AAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFSGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVK KDQNGNHVVQKCIECVQPSLQFIIDAFKGGQVFALSTHP YGSRVIRRIEHLCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSY VIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVVQ KCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSHTQLVQDQYG SYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVV EKCVTASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMDQY ANYVVQKMDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 447)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIVVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

20

【0 6 9 7】

【表 4 6 - 1】

表46:例示的な15PUF標的化 CUG 融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
15PUF	UGCUGCUGCU GCUGC	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIR LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFF EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIECVQP QSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPI LEELHQHTEQLVQDQYGNVVIQHVLEHGRPEDKSKIVA EIRGHIMEFSQDQHGSRFIRLKLERATPAERQLVFNEILQ

30

40

50

【表 4 6 - 2】

		AAAYQLMVDVFGSYVIEKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIECVQPQSLQFIIDAFKGGVVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGNYYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMKMDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号448)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIIVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

【0698】

【表 4 7】

表47:例示的な15PUF標的化CUG融合タンパク質

20

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
15PUF	UGCUGCUGCU GCUGC	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIR LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIEKFF EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGNRVIQKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVRKCIECVQP QSLQFIIDAFKGGVVFALSTHPYGSRVIERILEHCLPDQTLPI LEELHQHTEQLVQDQYGNYYVIQHVLEHGRPEDKSKIVAE IRGNVLVLSQHKFASYVVRKCVTHASRTERAVLIDEVCT MNDGPHSHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFN EILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGH VLKCVKDQNGSYVVEKIECVQPQSLQFIIDAFKGGVFA LSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQD QYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFA SNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMM KDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKY TYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 461)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIIVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

30

40

【0699】

50

【表 4 8】

表48:例示的な16PUF標的化CUG融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	PUFアミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
16PUF	UGCUGCUGCU GCUGCU (配列 番号 456)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQ LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFE FGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIPSD QQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQVQPSL QFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHCLPDQTLPILEE LHQHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEILQA AYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLS LALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVK DQNGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYG NRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIR HVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCV THASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYV VQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHTEQLVQDQYGSYVIRH VLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVT HASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVV QKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLE KYYMKNQVDLG (配列番号 449)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号 411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKILVFTPSRRVGGKRVVCYDDRFI VKLAYESDGIVVSNQTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

20

【0700】

【表 4 9 - 1】

表49:例示的な16PUF標的化CUG融合タンパク質

プラスミド エレメント	RNA認識	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号 437)
16PUF	UGCUGCUGCU GCUGCU (配列 番号 456)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFI QLKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKF FEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFI PSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQVQ PQSLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHCLPDQTL PILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIV AEIRGHIMEFSQDQHGNRFIQLKLERATPAERQLVFNEIL QAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRGHV LSLALQMYGSRVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLC VKDQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFKGQVFALSTH PYGSRVIRRIEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGS YVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFANNVV QKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQ YASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPNVLVLSQHKFA SNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMM

30

40

50

【表 49-2】

		KDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKY TYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号450)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVCYDDRFI VKLAYESDGIVVSNNTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

10

【0701】

【表 79】

プラスミド エレメント	RNA Recognition	アミノ酸配列
SV40 NLS	-	PKKKRKV (配列番号437)
16PUF	UGCUGCUGCU GCUGCU (配列 番号456)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNRFIQ LKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFF EFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSRVIEKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCTECVQP QSLQFIIDAFKGGQVFALSTHPYGSRVIRRIEHCLPDQTLPI LEELHQHTEQLVQDQYGSYVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFANNVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCT MNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQLVFNEI LQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIRGH VLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLC CVKDQNGSYVVEKCTECVQPQSLQFIIDAFKGGQVFALSTH PYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGS YVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVV EKCIVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQY ANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号451)
リンカー	-	VDTANGS (配列番号411)
E17 エンドヌクレアーゼ	-	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHG NKEVFSCRGILLAVNWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRP DVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGGKRVCYDDRFI VKLAYESDGIVVSNNTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYS FVNDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

【0702】

40

追加の PUF (CUG) RNA 標的化組成物は、以下のとおりである：

エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする 16 PUF N5

50

【表 80】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
n/a	16PUFN5	N末端Rb NLS、NLSと16PUFの間のリンカー、C末端E17、16PUFとE17の間にリンカーがある	UGCUGC UGCUGC UGC (配列番号 456)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIME FSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQLVFN EILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSL EQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSNVIE KALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVK DQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTL PILEELHQHIMEFSQDQHGNSFIELKLER ATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGN YVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSL ALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRE LDGHVLCVKDQNGSNVVEKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTL PILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNV VLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLI DEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYV VQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHTQLV QDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLSQHKFASNVVEKCVTHASRT ERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQ YANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGV DLG (配列番号 638)

10

20

表 T : 例示的な 16PUF 標的化 CUG 融合タンパク質 (遮断または*切断)

【表 T】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLKRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
16PUFN5	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSNVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHIMEFSQ DQHGNSFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSL EQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLC VKDQNGSNVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKQVFALSTHPYGSYVIRRIELH CLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNV VLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQY ANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHTQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPE DKSKIVAEIRGNVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGP HSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 638)
	(* エンドヌクレアーゼ、例えばE17、およびリンカー、例えば16 PUFとE17の間の VDTANGSを切断に用いる)

30

40

エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする 16PUFN6

50

【表 8 2】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
n/a	16PUFN6	N末端Rb NLS、NLSと 16PUFの間 のリンカー、 C末端E17、 16PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGC UGCUGC UGCUC	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIME FSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQLVFN EILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGL EQLALAEIRIRGHVLSLALQMYGSNVIE KALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVK DQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTL PILEELHQHTEQLVQDQYGSNVIEHVLE HGRPEDKSKIVAEIRGHIMEFSQDQHG NYFIQLKLERATPAERQLVFNILQAAYQL MVDVFGSYVIRKFFEFGLSLEQLALAEIR RGHVLSLALQMYGSNVIEKALEFIPSDQ QNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQ KCIQVQPSLQFIIDAFKQGVFALSTHP YGSYVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHT EQLVQDQYGSNVIEHVLEHGRPEDKSKI VAEIRGNVLSLQHKFANYVVQKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTM MKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVM HKIRPNVLSLQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTM MKDQYANYVVQKIDVAEPGQRKIVMHKI RPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKN GVDLG (配列番号 650)

10

20

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 8 3】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLKRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
16PUFN6	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGLSLEQLALAEIRIRGHVLSLALQ MYGSNVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFKQGVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSNVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGHIMEFSQDQHGNYFIQLKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGLSLEQLALAEIRIRGHVLSL ALQMYGSNVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQ VQPSLQFIIDAFKQGVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHTE QLVQDQYGSNVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLSLQHKFANYVVQKCV THASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTM MKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPNVLSLQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH SALYTM MKDQYANYVVQKIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKN GVDLG (配列番号650) (*エンドヌクレアーゼ、例えばE17、およびリンカー、例えば16 PUFとE17の間の VDTANGSを切断に用いる)

30

40

エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする16PUFN0

50

【表 8 4】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
n/a	16PUFN0	N末端Rb NLS、NLSと 16PUFの間の リンカー、 C末端E17、 16PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGC UGCUGC UGC (配列番号 456)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIME FSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQLVFN EILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGS LEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSNVIE KALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVK DQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTL PILEELHQHTEQLVQDQYGSNVIEHVLE HGRPEDKSKIVAEIRGNVVLVLSQHKFAN YVVQKCVTHASRTERAVLIDEVCTMND GPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVA EPGQRKIVMHKIRPHIMEFSQDQHGSNFI ELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMV DVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRG HVLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQN EMVRELDGHVLCVKDQNGSNVVEKCI ECVQPSLQFIIDAFKQGVFALSTHPYGN YVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQL VQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAE IRGNVVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRT ERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQ YANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRP HIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGV DLG (配列番号 639)

10

20

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 8 5】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
16PUFN0	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGNYFIQLKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGSYVIRKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSNVIEKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGNHVVQKCIQVQPSLQFIIDAFK GQVFALSTHPYGSYVIRRIELHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSNVIEHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVVLVLSQHKFANYVVQKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYASYVVRKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIMEFSQDQHGSNFIELKLERATPAERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIPSDQQN EMVRELDGHVLCVKDQNGSNVVEKCIQVQPSLQFIIDAFKQGVFALSTH PYGNYVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPE DKSKIVAEIRGNVVLVLSQHKFASNVVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGP HSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号639)
*リンカー	VDTANGS (配列番号411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRIVKLAYESDGIIVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号358)

30

40

Cへの変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf
3 (DM1) を標的とする8PUF

50

【表 8 6】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02139	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFSGLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSHVVEKCTECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号 640)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 8 7】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSHVVEKCTECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 640)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

C への変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf
3 (DM1) を標的とする 8 P U F

40

50

【表 8 8】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02140	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAEIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号 641)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 8 9】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAEIRIRGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 641)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

C への変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、C U G f
3 (DM1) を標的とする 8 P U F

40

50

【表 9 0】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02141	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSNVVEKCIQVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号 642)

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 9 1】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSNVVEKCIQVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGR PEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQY ANYVVQKMIDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 642)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNNTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

C への変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする 8PUF

10

20

30

40

50

【表 9 2】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02142	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSFVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSFVVEKCIQVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号643)

10

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 9 3】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSFVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSFVVEKCIQVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号643)
*リンカー	VDTANGS (配列番号411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGI VVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号358)

20

30

Cへの変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする8PUF

40

50

【表 9 4】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02143	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSFVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYMKNGVDLG (配列 番号 644)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 9 5】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSFVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYMKNGVDLG (配列番号 644)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNDTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

C への変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf
3 (DM1) を標的とする 8PUF

40

50

【表 9 6】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02144	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSHVVEKCIECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIR GNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHA SRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL YTMMKDQYANYVVQKMIDVAEP GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号 645)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 9 7】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	(配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSHVVEKCIECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 645)
*リンカー	VDTANGS
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

C への変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、C U G f
3 (DM1) を標的とする 8 P U F

40

50

【表 9 8】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02145	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAEIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSYVVEKCIECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIR GNVLVLSQHKFASNVEKCVTHA SRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL YTMMKDQYANYVVQK MIDVAEP GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号 646)

10

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 9 9】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGS
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAEIRIGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQK MIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 646)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

Cへの変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする8PUF

40

50

【表 100】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02146	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIR GHVLSLALQMYGSRVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSNVVEKCIECVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIR GNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHA SRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL YTMMKDQYANYVVQKMIDVAEP GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号647)

10

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 101】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIRGHVLSLALQM YGSRVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSNVVEKCIECVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号647)
*リンカー	VDTANGS (配列番号411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号358)

20

30

Cへの変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする8PUF

40

50

【表 102】

構築物	タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02147	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIR GHVLSLALQMYGSFVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSFVVEKCIQCVQPQSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIR GNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHA SRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL YTMMKDQYANYVVQKMDVAEP GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列 番号648)

10

N末端からC末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列（遮断または＊切断）

【表 103】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFGSLEQKLALAEIRGHVLSLALQM YGSFVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSFVVEKCIQCVQPQ SLQFIIDAFKGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQ DQYGSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEKCVTHAS RTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQYANYVVQKMDVAEPGQRKIV MHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号648)
*リンカー	VDTANGS (配列番号411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQPRPDVPITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNNTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号358)

20

30

Cへの変異のスタッキングを伴う、エンドヌクレアーゼを伴うまたは伴わない、CUGf3 (DM1) を標的とする8PUF

40

50

【表 104】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A02148	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSRFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSFVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSFVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEIR GNVLVLSQHKFASNVEKCVTHA SRTERAVLIDEVCTMNDGPHSAL YTMMKDQYANYVVQKMDVAEP GQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGK HILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 649)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 105】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLKRSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFEFSGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSFVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSYVVEKCIQVQPSLQFIIDAFK KGQVFALSTHPYGNRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSFVIRHVLEHGR PEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDQY ANYVVQKMDVAEPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYYMKNGVDLG (配列番号 649)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

エンドヌクレアーゼとともにまたはなしで使用するための、変異のスタッキングを伴う、
CUGf3 (DM1) を標的とする 8PUF

40

50

【表 106】

構築物	タンパク質のタイプ	エレメント	標的配列	PUFアミノ酸配列
A01926	8PUF	N末端Rb NLS、NLSと 8PUFの間の リンカー、C 末端E17、 8PUFとE17 の間にリン カーがある	UGCUGCUG	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAG HIMEFSQDQHGSNFIELKLERATP AERQLVFNEILQAAYQLMVDVFG NYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIR GHVLSLALQMYGSYVIRKALEFIP SDQQNEMVRELDGHVLCVKDQ NGSNVVEKCIQCVQPSLQFIIDAF KGQVFALSTHPYGNVVIQRILEHC LPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQY GSYVIRHVLEHGRPEDKSKIVAEI RGNVLVLSQHKFASNVEKCVTH ASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSA LYTMMKDYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYG KHILAKLEKYMKNGVDLG (配列 番号 651)

10

N 末端から C 末端への順序での導入遺伝子エレメントのアミノ酸配列 (遮断または＊切断)

【表 107】

プラスミド エレメント	アミノ酸配列
Rb-NLS	DRVLRKSAEGSNPPKPLKKLR (配列番号 543)
リンカー	GGG
8PUF	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHIMEFSQDQHGSNFIELKLERATPAERQL VFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQKFFFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLALQM YGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVRELDGHVLCVKDQNGSNVVEKCIQCVQPSLQFIIDAFK KGQVFALSTHPYGNVVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHTEQLVQDQYGSYVIRHVLEH GRPEDKSKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVEKCVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPHSALYTMMKDY ANYVVQKMIDVAEAPGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKHILAKLEKYMKNGVDLG (配列番号 651)
*リンカー	VDTANGS (配列番号 411)
*エンドヌクレアーゼ	GGGTPKAPNLEPPLPEEEKEGSDLRPVVIDGSNVAMSHGNKEVFSCRGILLAV NWFLERGHDTITVFVPSWRKEQRPDPVITDQHILRELEKKKILVFTPSRRVGG KRVVCYDDRFIVKLAYESDGIVVSNPTYRDLQGERQEWKRFIEERLLMYSFV NDKFMPPDDPLGRHGPSLDNFLRKKPLTLE (配列番号 358)

20

30

ベクター

【0703】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイド RNA を含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイド RNA を少なくとも 1 つ含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイド RNA を 1 つまたは複数含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイド RNA を 2 つまたはそれよりも多く含む。一実施形態では、ベクターは、3 つのガイド RNA を含む。一実施形態では、ベクターは、4 つのガイド RNA を含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示のガイドされるまたはガイドされない RNA 結合性タンパク質をさらに含む。一部の実施形態では、ベクターは、本開示の RNA 結合性融合タンパク質をさらに含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、第 1 の RNA 結合性タンパク質および第 2 の RNA 結合性タンパク質を含む。一部の実施形態では、RNA 結合性タンパク質と g RNA とを含む、RNA によりガイドされる RNA 結合性の系は、単一のベクター内に存在する。特定の実施形態では、単一のベクターは、Cas13d RNA によりガイドされる RNA 結合性の系、または触媒的に不活性化されている Cas13d (dCas13d) RNA によりガイドされる RNA 結合性の系である、RNA によりガイドされる RNA 結合性の系を含む。一実施形

40

50

態では、単一のベクターは、C a s R x または d C a s R x RNA によりガイドされる RNA 結合性の系である、C a s 1 3 d RNA によりガイドされる RNA 結合性の系を含む。別の実施形態では、単一のベクターは、E 1 7（配列番号 3 5 8）などの Z C 3 H 1 2 A からのヌクレアーゼドメインと融合した、P U F または P U M B Y に基づくタンパク質を含む、ガイドされない RNA 結合性の系を含む。別の実施形態では、単一のベクターは、E 1 7（配列番号 3 5 8）などの Z C 3 H 1 2 A からのヌクレアーゼドメインと融合した、d C a s 1 3 d RNA 結合性の系を含む。

【0704】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、第 1 のベクターが本開示のガイド RNA を含み、第 2 のベクターが本開示の RNA 結合性タンパク質または RNA 結合性融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、第 1 のベクターは、本開示のガイド RNA を少なくとも 1 つ含む。一部の実施形態では、第 1 のベクターは、本開示のガイド RNA を 1 つまたは複数含む。一部の実施形態では、第 1 のベクターは、本開示のガイド RNA を 2 つまたはそれよりも多く含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、第 1 の RNA 結合性タンパク質と第 2 の RNA 結合性タンパク質とを含む。一部の実施形態では、第 1 のベクターと第 2 のベクターは同一のベクターまたはベクター血清型である。一部の実施形態では、第 1 のベクターと第 2 のベクターは同一ではないベクターまたはベクター血清型である。本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、毒性 C U G RNA リピートを標的とすることができる RNA 結合性の系は、単一のベクター内に存在する。

【0705】

1 つのタイプのベクターは、「プラスミド」であり、プラスミドは、追加の DNA セグメントが、例えば標準的な分子クローニング技法により、挿入され得る、環状二本鎖 DNA ループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルス由来の DNA または RNA 配列が、ウイルス（例えば、レトロウイルス、複製欠損型レトロウイルス、アデノウイルス、複製欠損型アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）へのパッケージングのためのベクター内に存在する、ウイルスベクターである。ウイルスベクターは、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって運ばれるポリヌクレオチドも含む。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルス（例えば、組込み欠損型レンチウイルスベクター）またはアデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターである。ベクター、例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターなどは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができ、エピソード哺乳動物ベクター、および他のベクター、例えば非エピソード哺乳動物ベクターなどは、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。

【0706】

一部の実施形態では、ベクター、例えば、発現ベクターなどは、それらが作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示することができる。一般的な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。一部の実施形態では、組換え発現ベクターは、本明細書において提供される核酸、例えば、DNA 配列から発現され得るガイド RNA、および C a s 1 3 d タンパク質をコードする核酸などを、宿主細胞におけるタンパク質の発現に好適な形態で含む。組換え発現ベクターは、発現に使用されることになる宿主細胞に基づいて選択され得る 1 つまたは複数の調節エレメントであって、発現されることになる核酸配列に作動可能に連結されている調節エレメントを含む。組換え発現ベクター内で、「作動可能に連結されている」は、目的のヌクレオチド配列が、例えば、i n v i t r o 転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入されたときに宿主細胞において、などにおいて、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で、調節エレメントに連結されていることを意味するように意図されている。ベクターのある特定の実施形態は、形質転換されることになる宿主細胞の選択、および所望される発現レベルなどの、因子に依存する。ベクターを宿主細胞に導入して、それによって、例えば、C R I S P R 転写物、タンパク質、酵素、その変異体形態、その融合タンパク質などのような、本明細書に記載の核酸によりコードされる融合タンパク質またはペプチドを含む、転写物、タンパク質、または

ペプチドを産生することができる。

【0707】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスから単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、複製能力がない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、単離されたものまたは組み換えられたものである。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、自己相補的である。

10

【0708】

用語「アデノ随伴ウイルス」または「AAV」は、本明細書で使用される場合、この名前に関連するウイルスの綱のメンバーであって、Parvoviridae科、Dependoparvovirus属に属するメンバーを指す。アデノ随伴ウイルスは、ある特定の機能がヘルパーウイルスの同時感染により提供される細胞において成長する一本鎖DNAウイルスである。AAVの一般的な情報および総説は、例えば、Carter, 1989, Handbook of Parvoviruses, Vol. 1, pp. 169-228、およびBerns, 1990, Virology, pp. 1743-1764, Raven Press, (New York)において見つけることができる。これらの総説に記載されている同じ原理が、これらの総説の発表日後に特徴付けられた追加のAAV血清型に適用可能であることは、十分に予想される。なぜなら、多様な血清型が、構造的にも機能的にも、さらには遺伝子レベルで、非常に密接に関連していることは周知であるからである。(例えば、Blacklowe, 1988, pp. 165-174 of Parvoviruses and Human Disease, J. R. Pattison, ed.; およびRose, Comprehensive Virology 3: 1-61 (1974)を参照されたい)。例えば、全てのAAV血清型は、相同rep遺伝子により媒介される非常に類似した複製特性を示すようであり、全てが、3つの関連カプシドタンパク質、例えば、AAV2に発現されるものを有する。この類似度は、ゲノムの長さに沿った血清型間の過度の交差ハイブリダイゼーションを明示するヘテロ二本鎖解析; および「末端逆位反復配列」(ITR)に対応する末端における類似の自己アニーリングセグメントの存在によってさらに示唆される。類似した感染力パターンも、各血清型における複製機能が、類似した調節制御下にあることを示唆する。このウイルスの複数の血清型は、遺伝子送達に好適であることが公知であり、あらゆる公知血清型が、種々の組織型からの細胞に感染し得る。

20

30

【0709】

AAVは、そのAAVを、例えば遺伝子治療において、外来DNAを細胞に送達するベクターとして魅力的なものにする、独特の特徴を有する。培養下の細胞のAAV感染は、非細胞変性性であり、ヒトおよび他の動物の自然感染は、無症状および無症候性である。さらに、AAVは、多くの哺乳動物細胞に感染し、それによって、in vivoで多くの異なる組織を標的とする可能性が認められる。さらに、AAVは、分裂および非分裂細胞に緩徐に形質導入し、本質的にこれらの細胞の寿命にわたって転写活性核エピソーム(染色体外エレメント)として存続することができる。AAVプロウイルスゲノムは、プラスミド内にクローン化DNAとして挿入され、そのため組換えゲノムの構築が実現可能になる。さらに、AAVの複製およびゲノムカプシド封入を指示するシグナルがAAVゲノムのITR内に含有されているため、AAVベクターを生成するために内部のおおよそ4.3 kbのゲノム(複製および構造カプシドタンパク質、rep-cap、をコードする)の一部または全てを外来DNAに置き換えることができる。repおよびcapタンパク質をin transで提供することができる。AAVのもう1つの有意な特徴は、極めて安定している丈夫なウイルスであることである。AAVは、アデノウイルスを不活性

40

50

化するために使用される条件（56℃～65℃、数時間）にたやすく耐え、そのためAAVの低温保存があまり重要でなくなる。AAVを凍結乾燥させることさえできる。最終的に、AAV感染細胞は、重複感染に対して耐性がない。

【0710】

本発明のAAV（rAAVまたはAAVベクター）ゲノムは、CUGリピート標的化組成物（例えば、PUF、PUMBY、またはRNAによりガイドされるタンパク質）をコードする核酸分子、およびその核酸分子に隣接している1つまたは複数のAAV ITRを含む、それらから本質的になる、またはそれらからなる。偽型AAVの産生は、例えば、WO2001083692において開示されている。他のタイプのAAVバリエーション、例えば、カプシド変異を有するrAAVも、企図される。例えば、Marsic et al., Molecular Therapy, 22(11): 1900-1909 (2014)を参照されたい。様々なAAV血清型のゲノムのヌクレオチド配列が、当技術分野において公知である。

【0711】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（AAV）から単離されたまたはそれに由来する配列を含む。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、血清型AAVrh.74、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10（AAVrh10）、AAV11またはAAV12のAAVから単離されるまたはそれに由来する、末端逆位反復配列またはカプシド配列を含む。一実施形態では、AAVベクターは、改変されたカプシドを含む。一実施形態では、AAVベクターは、AAV2-Tyr変異体ベクターである。一実施形態では、AAVベクターは、非チロシンアミノ酸が、野生型AAV2の位置Tyr252、Tyr272、Tyr275、Tyr281、Tyr508、Tyr612、Tyr704、Tyr720、Tyr730またはTyr673の表面露出チロシン残基に対応する位置にある、カプシドを含む。その全体が本明細書に組み込まれるWO2008/124724も参照されたい。一部の実施形態では、AAVベクターは、操作されたカプシドを含む。操作されたカプシドを含むAAVベクターとしては、限定することなく、AAV2.7m8、AAV9.7m8、AAV2.2tYF、およびAAV8.Y733Fが挙げられる。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、複製能力がない。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、単離されたものまたは組み換えられたもの（rAAV）である。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、自己相補的（scAAV）である。

【0712】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示のベクターは、非ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、ナノ粒子、ミセル、リポソームまたはリポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックスまたはデンドリマーを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたは組換え発現系である。本明細書で使用される場合、「組換え発現系」という用語は、組換えによって形成されたある特定の遺伝子材料を発現させるための遺伝子構築物を指す。

【0713】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本明細書に提示される発現ベクター、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、これだけに限定することなく、発現制御エレメントを含む。「発現制御エレメント」は、本明細書で使用される場合、遺伝子などのコード配列の発現を調節する任意の配列を指す。例示的な発現制御エレメントとしては、これだけに限定されないが、プロモーター、エンハンサー、マイクロRNA、転写後調節エレメント、ポリアデニル化シグナル配列、およびイントロンが挙げられる。発現制御エレメントは、例えば、構成的、誘導性、抑制性、または組織特異的であり得る。「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御されるポリヌクレオチド配列の領域である制御配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節性タンパク質および分子が結合することができる遺伝子エレメントを含有し得る。一部の実

施形態では、プロモーターによる発現制御は、組織特異的である。一部の実施形態では、プロモーターによる発現制御は、構成的または遍在性である。非限定的な例示的なプロモーターとしては、P o l I I Iプロモーター、例えばU 6およびH 1プロモーターなど、ならびに／またはP o l I I Iプロモーター、例えばS V 4 0、C M V（必要に応じて、C M Vエンハンサーを含む）、R S V（ラウス肉腫ウイルス）L T Rプロモーター（必要に応じて、R S Vエンハンサーを含む）、C B A（ハイブリッドC M Vエンハンサー／ニワトリβ-アクチン）、C A G（ニワトリβ-アクチンと融合したハイブリッドC M Vエンハンサー）、短縮化C A G、C b h（ハイブリッドC B A）、E F-1 a（ヒト伸長因子アルファ-1）またはE F S（短い、イントロン不含の、E F-1アルファ）、P G K（ホスホグリセロールキナーゼ）、C E F（ニワトリ胚線維芽細胞）、U B C（ユビキチンC）、G U S B（リソソーム酵素ベータ-グルクロニダーゼ）、U C O E（遍在性クロマチンオープニングエレメント）、h A A T（アルファ-1アンチトリプシン）、T B G（チロキシン結合性グロブリン）、デスミン（全長または短縮化）、M C K（筋クレアチンキナーゼ）、C 5-1 2（合成筋プロモーター）、C K 8 e（クリアチンキナーゼ8）、N S E（ニューロン特異的エノラーゼ）、シナプシン、シナプシン-1（S Y N-1）、オブシン、P D G F（血小板由来増殖因子）、P D G F-A、M e c P 2（メチルC p G結合性タンパク質2）、C a M K I I（カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼI I）、m G l u R 2（代謝型グルタミン酸受容体2）、N F L（ニューロフィラメント軽鎖）、N F H（ニューロフィラメント重鎖）、n β 2、P P E（ラットプレプロエンケファリン）、E N K（プレプロエンケファリン）、プレプロエンケファリン-ニューロフィラメントキメラプロモーター、E A A T 2（グルタミン酸輸送体）、G F A P（グリア細胞線維性酸性タンパク質）、M B P（ミエリン塩基性タンパク質）、ヒトロドプシンキナーゼプロモーター（h G R K 1）、β-アクチンプロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、M H C K 7（筋クレアチンキナーゼおよびアルファミオシン重鎖遺伝子のエンハンサー／プロモーター領域のハイブリッドプロモーター）、ならびにこれらの組合せが挙げられる。「エンハンサー」は、活性化タンパク質が結合して転写の尤度または頻度を増加させることができる、D N Aの領域である。非限定的な例示的なエンハンサーおよび転写後調節エレメントとしては、C M Vエンハンサー、M C Kエンハンサー、H T L V-1のL T R内のR-U 5'セグメント、S V 4 0エンハンサー、ウサギβ-グロビンのエクソン2と3の間のイントロン配列、ならびにウッドチャック肝炎ウイルス（W H P）転写後調節エレメント（W P R E）が挙げられる。一部の実施形態では、イントロン、例えば、U B Bイントロンは、プロモーター活性を増強するために使用される。一部の実施形態では、U B Bイントロンは、E F Sプロモーターとともに使用される。

10

20

30

40

50

【0714】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本明細書に提示される発現ベクター、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターは、これだけに限定することなく、「マルチシストロン性」または「ポリシストロン性」または「バイシストロン性」または「トリシストロン性」構築物の配置（c o n f i g u r a t i o n）のためのI R E Sまたは2 Aペプチド部位を含む、すなわち、二重もしくは三重もしくは多重のコード領域またはエクソンなどのベクターエレメントを有し、したがって、単一の構築物から、m R N Aから2つまたはそれよりも多くのタンパク質を発現させる能力を有する。マルチシストロン性ベクターは、同じm R N Aから2つまたはそれよりも多くの別々のタンパク質を同時に発現させる。マルチシストロン性配置を構築するために最も広く使用されている2つの戦略は、I R E Sまたは2 A自己切断部位を使用することである。「I R E S」は、ポリシストロニックベクター構築物に使用される、ウイルス、原核生物、または真核生物を起源とする配列内リボソーム進入部位またはその一部を指す。一部の実施形態では、I R E Sは、キャップ依存的に翻訳開始を可能にするR N Aエレメントである。「自己切断ペプチド」または「自己切断ペプチドをコードする配列」または「2 A自己切断部位」という用語は、リボソームスキッピングを促進するため、したがって、単一のプロモーターから2つ

のポリペプチドを生成するための部位を組み入れるためにベクター構築物内に使用される連結配列を指す。そのような自己切断ペプチドとしては、これだけに限定することなく、T2Aペプチド、およびP2Aペプチドまたは自己切断ペプチドをコードする配列が挙げられる。

【0715】

一実施形態では、例示的なベクター構成は、図4A～4Cに示される。例示的なベクター構成は、CUG標的化PUF-エンドヌクレアーゼ融合体をコードする核酸の発現を駆動する、プロモーターまたは調節配列（プロモーター／エンハンサーの組合せ）を含む。別の実施形態では、ベクター構成は、RNAによりガイドされるCas RNase RNA結合性タンパク質の発現を駆動するプロモーター、または同族gRNAの発現を駆動する第2のプロモーターと作動可能に連結しているdCasタンパク質融合体を含む。別の実施形態では、ベクター構成は、リンカーおよび1つまたは複数のタグを含む。

【0716】

一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、またはレンチウイルスベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、アデノウイルス／レトロウイルスキメラベクター、単純ヘルペスウイルスIもしくはIIベクター、パルボウイルスベクター、細網内皮症ウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、乳頭腫ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、または2つまたはそれよりも多くのウイルスベクターの好都合な側面が組み入れられた任意のハイブリッドもしくはキメラベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、ポリヌクレオチドに作動可能に連結した1つまたは複数の発現制御エレメントをさらに含む。一部の実施形態では、ベクターは、1つまたは複数の選択マーカーをさらに含む。一部の実施形態では、AAVベクターは低毒性を有する。一部の実施形態では、AAVベクターは宿主ゲノム内に組み入れられず、それにより、挿入変異誘発が引き起こされる確率が低くなる。一部の実施形態では、AAVベクターは、4.5 kbから4.75 kbまでの範囲の総ポリヌクレオチドをコードし得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、系、方法、およびキットのいずれかに使用することができる例示的なAAVベクターとしては、AAV1ベクター、改変AAV1ベクター、AAV2ベクター、改変AAV2ベクター、AAV2-Tyr変異体ベクター、AAV3ベクター、改変AAV3ベクター、AAV4ベクター、改変AAV4ベクター、AAV5ベクター、改変AAV5ベクター、AAV6ベクター、改変AAV6ベクター、AAV7ベクター、改変AAV7ベクター、AAV8ベクター、AAV9ベクター、AAV.rh10ベクター、改変AAV.rh10ベクター、AAV.rh32/33ベクター、改変AAV.rh32/33ベクター、AAV.rh43ベクター、改変AAV.rh43ベクター、AAV.rh64R1ベクター、AAV-Tyr変異体ベクター、および改変AAV.rh64R1ベクターおよび任意の組合せまたはその等価物を挙げることができる。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、インテグラーゼコンピテントレンチウイルスベクター（ICLV）である。一部の実施形態では、レンチウイルスベクターは、導入遺伝子プラスミドベクターならびに関連するプラスミド（例えば、パッケージングプラスミド、rev発現プラスミド、エンベローププラスミド）と併せた導入遺伝子プラスミドベクターならびにウイルスまたはウイルス様侵入機構によって外因性核酸を細胞に導入することができるレンチウイルスに基づく粒子を指し得る。レンチウイルスベクターは、当技術分野で周知である（例えば、Trono D. (2002) *Lentiviral vectors*, New York: Springer-Verlag Berlin HeidelbergおよびDurand et al. (2011) *Viruses* 3 (2): 132-159 doi: 10.3390/v3020132を参照されたい）。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物、系、方法、およびキットのいずれかに使用することができる例示的なレンチウイルスベクターとしては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1ベクター、改変ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1ベクター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）2ベクター、改

変ヒト免疫不全ウイルス（HIV）2ベクター、スーティーマンガベイサル免疫不全ウイルス（SIV_{SM}）ベクター、改変スーティーマンガベイサル免疫不全ウイルス（SIV_{SM}）ベクター、アフリカミドリザルサル免疫不全ウイルス（SIV_{AGM}）ベクター、改変アフリカミドリザルサル免疫不全ウイルス（SIV_{AGM}）ベクター、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）ベクター、改変ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）ベクター、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）ベクター、改変ネコ免疫不全ウイルス（FIV）ベクター、ビスナ／マエディウイルス（VNV／VMV）ベクター、改変ビスナ／マエディウイルス（VNV／VMV）ベクター、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）ベクター、改変ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）ベクター、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、または改変ウシ免疫不全ウイルス（BIV）を挙げることができる。

10

核酸

【0717】

本明細書に記載の遺伝子移入および発現技法における使用のための、本明細書に開示されるRNA結合性CUGリピート標的化系をコードする核酸配列が本明細書に提示される。必ずしも明記されていないが、本明細書に提示される配列を使用して、同じ生物学的性質を有するタンパク質を生じさせる発現産物ならびに実質的に同一の配列をもたらすことができることが理解されるべきである。これらの「生物学的に等価の」または「生物活性ある」または「等価の」ポリペプチドは、本明細書に記載の等価のポリヌクレオチドによってコードされる。これらは、デフォルトの条件下で実行される配列同一性方法を使用して比較した場合に、参照ポリペプチドに対して少なくとも60%、あるいは少なくとも65%、あるいは少なくとも70%、あるいは少なくとも75%、あるいは少なくとも80%、あるいは少なくとも85%、あるいは少なくとも90%、あるいは少なくとも95%あるいは少なくとも98%同一の一次アミノ酸配列を有することができる。特定の実施形態の例として特定のポリペプチド配列が提示されている。同様の電荷を有する代替のアミノ酸を用いたアミノ酸への配列の改変。さらに、等価のポリヌクレオチドは、参照ポリヌクレオチドもしくはその相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである、またはポリペプチドに関しては、参照コードポリヌクレオチドまたはその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである。あるいは、等価のポリペプチドまたはタンパク質は、等価のポリヌクレオチドから発現されるものである。

20

30

【0718】

本明細書に開示される核酸配列（例えば、ポリヌクレオチド配列）は、当技術分野で周知の技法であるコドン最適化がなされたものであり得る。本明細書に開示される一部の実施形態では、例えば配列番号92（CasRxとして公知のCas13d）をコードする核酸配列または配列番号298（CasRxとして公知のCas13d）をコードする核酸配列などの例示的なCas配列は、ヒト細胞における発現に関してコドン最適化されている。コドン最適化は、異なる細胞では特定のコードンの使用が異なるという事実を指す。このコードンの偏りは、細胞型における特定のtRNAの相対的な存在量の偏りに対応する。配列内のコードンに対応するtRNAの相対的な存在量と釣り合うように変更することにより、発現を増加させることが可能である。対応するtRNAが特定の細胞型において希であることが分かっているコードンを故意に選択することによって発現を低減させることも可能である。哺乳動物細胞に関して、ならびに種々の他の生物体に関してコドン使用表が当技術分野で公知である。遺伝暗号に基づいて、例えばCasタンパク質をコードする核酸配列を生成することができる。一部の実施形態では、そのような配列を、例えば、Casタンパク質を発現する宿主細胞または開示されている方法が実施される細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞など）を使用するなど、宿主または標的細胞における発現に関して最適化する。特定の種についてのコードンの選好およびコドン使用表を使用して、その特定の種のコードン使用選好性（codon usage preference）を活用する、Casタンパク質をコードする単離された核酸分子（例えば、その対応する野生型タンパク質に対する少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少

40

50

なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有するタンパク質をコードするものなど)を操作することができる。例えば、本明細書に開示されるCasタンパク質を、目的の特定の生物体によって優先的に使用されるコドンを含むように設計することができる。一実施例では、Cas核酸配列は、例えば、その対応する野生型または起源核酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%配列同一性を有するものなど、ヒト細胞における発現に関して最適化されたものである。一部の実施形態では、少なくとも1つのCasタンパク質(ベクターの一部であり得る)をコードする単離された核酸分子は、真核細胞における発現に関してコドン最適化された少なくとも1つのCasタンパク質コード配列、またはヒト細胞における発現に関してコドン最適化された少なくとも1つのCasタンパク質コード配列を含む。一実施形態では、そのようなコドン最適化されたCasコード配列は、その対応する野生型または起源配列に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有する。別の実施形態では、真核細胞のコドン最適化された核酸配列は、その対応する野生型または起源タンパク質に対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%配列同一性を有するCasタンパク質をコードする。別の実施形態では、配列は異なるが同じCasタンパク質配列をコードする核酸などの、機能的に等価の核酸を含有する種々のクローンを常套的に生成することができる。コード配列内のサイレント変異は、1つよりも多くのコドンが同じアミノ酸残基をコードし得る遺伝暗号の縮退(すなわち、重複性)に起因する。したがって、例えば、ロイシンはCTT、CTC、CTA、CTG、TTA、またはTTGによってコードされ得る;セリンはTCT、TCC、TCA、TCG、AGT、またはAGCによってコードされ得る;アスパラギンはAATまたはAACによってコードされ得る;アスパラギン酸はGATまたはGACによってコードされ得る;システインはTGTまたはTGCによってコードされ得る;アラニンはGCT、GCC、GCA、またはGCGによってコードされ得る;グルタミンはCAAまたはCAGによってコードされ得る;チロシンはTATまたはTACによってコードされ得る;およびイソロイシンはATT、ATC、またはATAによってコードされ得る。標準の遺伝暗号を示す表は、種々の供給源に見いだすことができる(例えば、Stryer, 1988, Biochemistry, 3. sup. rd Edition, W. H. Freeman and Co., NYを参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0719】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグスティーン結合、または任意の他の配列特異的様式で存在する。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つまたはそれよりも多くの鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、PC反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などのより広範囲にわたるプロセスのステップを構成し得る。

【0720】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、インキュベーション温度、約25℃～約37℃;ハイブリダイゼーション緩衝液濃度、約6×SSC～約10×SSC;ホルムアミド濃度、約0%～約25%;および洗浄溶液、約4×SSC～約8×SSCが挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、インキュベーション温度、約40℃～約50℃;緩衝液濃度、約9×SSC～約2×SSC;ホルムアミド濃度、約30%～約50%;および洗浄溶液、約5×SSC～約2×SSCが挙げら

れる。高ストリンジェンシー条件の例としては、インキュベーション温度、約 55℃～約 68℃；緩衝液濃度、約 1×SSC～約 0.1×SSC；ホルムアミド濃度、約 55%～約 75%；および洗浄溶液、約 1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン水が挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は 5 分間から 24 時間までであり、1 回、2 回、またはそれよりも多くの洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約 1 分間、2 分間、または 15 分間である。SSC は、0.15 M の NaCl および 15 mM のクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用した SSC の等価物を使用することができることが理解される。

【0721】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2 つのペプチド間または 2 つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較のためにアラインメントすることができる各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置を同じ塩基またはアミノ酸が占めている場合、その分子は、その位置において相同である。配列間の相同性程度は、それらの配列が共有するマッチするまたは相同な位置の数に応じる。「関連しない」または「非相同的」配列は、本発明の配列の 1 つと 40% 未満の同一性あるいは 25% 未満の同一性を共有する。

細胞

【0722】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、原核細胞である。

【0723】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、真核細胞である。一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ウシ類、ネズミ類、ネコ類、ウマ類、ブタ類、イヌ類、サル類、またはヒトの細胞である。一部の実施形態では、細胞は、非ヒト霊長類細胞などの非ヒト哺乳動物細胞である。

【0724】

一部の実施形態では、本開示の細胞は、体細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、生殖細胞系列細胞である。一部の実施形態では、本開示の生殖細胞系列細胞は、ヒト細胞ではない。

【0725】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の細胞は、幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、胚性幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の胚性幹細胞は、ヒト細胞ではない。一部の実施形態では、本開示の細胞は、複能性幹細胞または多能性幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、成体幹細胞である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、人工多能性幹細胞 (iPSC) である。一部の実施形態では、本開示の細胞は、造血幹細胞 (HSC) である。

【0726】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、筋肉細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、筋芽細胞または筋細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、心筋細胞、骨格筋細胞または平滑筋細胞である。一部の実施形態では、本開示の筋肉細胞は、線条細胞である。一実施形態では、本明細書に開示される組成物で処置される患者の細胞 (単数または複数) としては、限定することなく、骨格筋 (発達中のおよび成熟した筋肉線維およびサテライト細胞)、神経筋接合部、心筋細胞、平滑筋細胞、末梢神経系 (ニューロン)、末梢運動ニューロン、および／または感覚ニューロンが挙げられる。

【0727】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、上皮細胞である。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、線維芽細胞、扁平上皮細胞、立方上皮細胞、円柱上皮細胞、重層上皮細胞、多列円柱上皮細胞または移行上皮細胞を形成する。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、これだけに限定されないが、松果体、胸腺、下垂体、甲状腺、副腎、アポクリン腺、ホロクリン腺、部分分泌腺、漿液腺、粘液腺および脂

10

20

30

40

50

腺を含めた腺を形成する。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、これだけに限定されないが、肺、脾臓、胃、膵臓、膀胱、腸、腎臓、胆嚢、肝臓、喉頭または咽頭を含めた器官の外表面と接触している。一部の実施形態では、本開示の上皮細胞は、血管または静脈の外表面と接触している。

【0728】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、初代細胞である。

【0729】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、培養細胞である。

【0730】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。

【0731】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の体細胞は、自家細胞または同種異系細胞である。

使用方法

【0732】

本開示は、本開示のRNA分子またはRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子をガイドRNAまたはRNA結合性タンパク質またはRNA結合性融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数がRNA分子に結合するのに適した条件下で接触させることを含む方法を提供する。

【0733】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を、RNA分子へのガイドRNAまたはRNA結合性タンパク質または融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数の結合に好適な条件下で接触させるステップを含む方法を提供する。

【0734】

本開示は、本開示のRNA分子の発現またはそのRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を含む細胞とを、RNA分子へのガイドRNAまたはRNA結合性タンパク質または融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数の結合に好適な条件下で接触させるステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、本開示の組成物は、本開示のガイドRNAと本開示のRNA結合性タンパク質または融合タンパク質とを含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

【0735】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を含む細胞とを、RNA分子へのガイドRNAまたはRNA結合性タンパク質または融合タンパク質（またはその一部）の1つまたは複数の結合に好適な条件下で接触させるステップを含む方法を提供する。

【0736】

本開示は、本開示のRNA分子の発現またはそのRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を、RNA結合性タンパク質または融合タンパク質がRNA分子の破壊（*break*）を誘導するRNAヌクレアーゼ活性に好適な条件下で、接触させるステップを含む方法を提供する。

【0737】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を、RNA結合性タンパク質または融合タンパク質がRNA

10

20

30

40

50

A分子の破壊を誘導するRNAヌクレアーゼ活性に好適な条件下で、接触させるステップを含む方法を提供する。

【0738】

本開示は、本開示のRNA分子の発現またはそのRNA分子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを改変する方法であって、本開示の組成物とRNA分子を含む細胞とを、RNA結合性タンパク質または融合タンパク質がRNA分子の破壊を誘導するRNAヌクレアーゼ活性に好適な条件下で、接触させるステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAと本開示のRNA結合性融合タンパク質とを含む組成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

10

【0739】

本開示は、RNA分子によってコードされるタンパク質の活性を改変する方法であって、組成物とRNA分子を含む細胞とを、RNA結合性タンパク質または融合タンパク質がRNA分子の破壊を誘導するRNAヌクレアーゼ活性に好適な条件下で、接触させるステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*または*in situ*にある。一部の実施形態では、組成物は、本開示のガイドRNAまたは単一ガイドRNAおよび本開示のRNA結合性タンパク質または融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組成物を含むベクターを含む。一部の実施形態では、ベクターは、AAVである。

20

【0740】

本開示は、疾患または障害を処置する方法であって、対象に本開示の組成物を治療有効量で投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、本開示は、DM1を処置する方法を提供する。

【0741】

本開示は、DM1の処置を、そのような処置を必要とする患者において行う方法であって、本開示の組成物の治療有効量を患者に投与するステップを含み、組成物が、本開示のガイドRNAを含むベクターと、本開示のRNA結合性タンパク質またはRNA結合性タンパク質融合タンパク質をコードする核酸配列とを含み、組成物が、毒性CUGリピートRNAの発現のレベルを（非標的化（NT）対照で処置された毒性CUGリピートRNAの発現のレベルと比較して、または無処置と比較して）改変する、低下させる、破壊する、下げるまたはより小さくする、方法を提供する。一実施形態では、標的毒性CUGリピートRNAのまたは標的RNAによりコードされる毒性リピートの低減のレベルが、RCas9系で処置されたときの標的RNAのまたは標的RNAによりコードされる毒性リピートの低減のレベルと比較される。別の実施形態では、低減のレベルは、1倍である、またはそれより大きい。別の実施形態では、低減のレベルは、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍である。別の実施形態では、低減のレベルは、10倍である、またはそれより大きい。別の実施形態では、低減のレベルは、10倍～20倍の間である。別の実施形態では、低減のレベルは、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、または20倍である。別の実施形態では、本明細書に開示される遺伝子治療用組成物は、DM1患者に投与されたとき、毒性CUGリピートRNAの20%～100%分解（または消失）をもたらす。一実施形態では、毒性CUGリピートRNAの%消失は、20～99%、25%～99%、50%～99%、80%～99%、90%～99%、95%～99%のいずれかである。一実施形態では、%消失は、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%である。別の実施形態では、%消失は、毒性CUGリピートRNAの完全消失または100%消失である。

30

40

【0742】

本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、処置されることになる患者の疾患または障害としては、限定することなく、CTGマイクロサテライトリピート伸長の発現に

50

関連する疾患または障害が挙げられる。一部の実施形態では、疾患または障害は、D M P K 遺伝子の 3' 非翻訳領域における C T G マイクロサテライトリピート伸長に関連する。本開示の組成物および方法の一部の実施形態では、本開示の疾患または障害は、筋強直性ジストロフィー 1 型 (D M 1) である。

【0743】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、D M 1 の診断を受けている。一部の実施形態では、本開示の対象は、D M 1 についての少なくとも 1 つの徴候または症状を示している。少なくとも 1 つの D M 1 徴候または D M 1 症状は、限定することなく、筋強直、筋萎縮、集中した筋核、筋力回復、G I 苦痛、心伝導障害、嚥下障害、呼吸容量を含む。一実施形態では、D M 1 についての少なくとも 1 つの徴候または症状は、本明細書

10

【0744】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、女性である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、男性である。一部の実施形態では、本開示の対象は、2 つの染色体 X X または X Y を有する。一部の実施形態では、本開示の対象は、2 つの染色体 X X または X Y および第 3 の染色体、X または Y のいずれかを有する。

【0745】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、新生児、乳児、小児、成人、年配成人、または高齢成人である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも 1 日齢、2 日齢、3 日齢、4 日齢、5 日齢、6 日齢、7 日齢、8 日齢、9 日齢、10 日齢、11 日齢、12 日齢、13 日齢、14 日齢、15 日齢、16 日齢、17 日齢、18 日齢、19 日齢、20 日齢、21 日齢、22 日齢、23 日齢、24 日齢、25 日齢、26 日齢、27 日齢、28 日齢、29 日齢、30 日齢または 31 日齢である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも 1 カ月齢、2 カ月齢、3 カ月齢、4 カ月齢、5 カ月齢、6 カ月齢、7 カ月齢、8 カ月齢、9 カ月齢、10 カ月齢、11 カ月齢または 12 カ月齢である。本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、少なくとも 1 歳、2 歳、3 歳、4 歳、5 歳、6 歳、7 歳、8 歳、9 歳、10 歳、15 歳、20 歳、25 歳、30 歳、35 歳、40 歳、45 歳、50 歳、55 歳、60 歳、65 歳、70 歳、75 歳、80 歳、85 歳、90 歳、95 歳、100 歳またはその間の任意の年齢または部分年齢である。

20

30

【0746】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、哺乳動物である。一部の実施形態では、本開示の対象は、非ヒト哺乳動物である。

【0747】

本開示の方法の一部の実施形態では、本開示の対象は、ヒトである。

【0748】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、単回用量の本開示の組成物を含む。一部の実施形態では、治療有効量は、少なくとも 1 用量の本開示の組成物を含む。一部の実施形態では、治療有効量は、1 用量または複数用量の本開示の組成物を含む。

40

【0749】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の徴候または症状を排除するものである。一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の徴候または症状の重症度を低下させるものである。

【0750】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害を排除するものである。

【0751】

本開示の方法の一部の実施形態では、治療有効量は、疾患または障害の発症を防止する

50

50

れる、方法。

【0769】

実施形態15：組成物の投与が、静脈内投与による、いずれかの前記実施形態に記載の実施形態。

【0770】

実施形態16：DM1を有する哺乳動物の組織における毒性CUGマイクロサテライトリピート伸長(MRE)RNAを消失させる方法であって、CUG MRE RNA配列を、組成物と、CUG MRE RNAへの組成物の結合に好適な条件下で接触させるステップを含み、組成物が、a) UGCUGCUG (配列番号453)を含む毒性標的配列に結合することができるPUFまたはPUMBY RNA結合性配列と、b) 毒性標的RNA配列を切断することができるエンドヌクレアーゼとを含む融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、それによって毒性標的RNAが消失される方法。一実施形態では、毒性標的RNAの切断によって、毒性標的RNAの発現レベルが低下される。別の実施形態では、毒性標的RNAの発現レベルの低下によって、毒性標的RNAが消失される。

【0771】

実施形態17：a) UGCUGCUG (配列番号453)を含む毒性標的配列に結合することができるPUFまたはPUMBYタンパク質と、b) 毒性標的RNA配列を切断することができるエンドヌクレアーゼとを含むガイドされないRNA結合性融合タンパク質をコードする核酸配列を含む組成物。

【0772】

実施形態18：AAVベクターは、いずれかの前記実施形態に記載の組成物を含む。

【0773】

実施形態19：AAV9である、いずれかの前記実施形態に記載のAAVベクター。

【0774】

実施形態20：エンドヌクレアーゼが、RNase1、RNase4、RNase6、RNase7、RNase8、RNase2、RNase6PL、RNaseL、RNaseT2、RNase11、RNaseT2様、NOB1、ENDOV、ENDOG、ENDOD1、hFEN1、hSLFN14、hLACTB2、APEX2、ANG、HRSP12、ZC3H12A、RIDA、PDL6、NTHL、KIAA0391、APEX1、AGO2、EXO2、ZC3H12D、ERN2、PELO、YBEY、CPSF4L、hCG__2002731、ERCC1、RAC1、RAA1、RAB1、DNA2、FLJ35220、FLJ13173、ERCC4、RNase1(K41R)、RNase1(K41R、D121E)、RNase1(K41R、D121E、H119N)、RNase1(H119N)、RNase1(R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N)、RNase1(R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E)、RNase1(R39D、N67D、N88A、G89D、R91D)、TENM1、TENM2、RNaseK、TALEN、ZNF638、およびhSMG6(PIN)からなる群から選択される、いずれかの前記実施形態に記載の方法または組成物。実施形態XX：エンドヌクレアーゼが、__である、いずれかの前記実施形態に記載の方法または組成物。

【0775】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、RNA結合性ポリペプチドは、RNAによりガイドされるRNase Casタンパク質である。一部の実施形態では、Casタンパク質は、Cas13a、Cas13b、Cas13c、またはCas13dである。一部の実施形態では、Casタンパク質は、Cas13dである。

【0776】

一部の実施形態では、RNA結合性ポリペプチドは、ガイドされないRNA結合性ポリペプチドである。一部の実施形態では、ガイドされないRNA結合性ポリペプチドは、PUFタンパク質、またはPUMBYタンパク質である。一部の実施形態では、PUFまたはPUMBYタンパク質は、ヒトPUFまたはPUMBYタンパク質である。一部の実施

形態では、ガイドされないRNA結合性ポリペプチドは、PUFまたはPUMBY融合タンパク質である。一実施形態では、PUFまたはPUMBYに基づく第1のRNA結合性タンパク質は、第2のRNA結合性タンパク質と融合されている。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、配列番号358のZC3H12Aとして公知のジンクフィンガーエンドヌクレアーゼのヌクレアーゼドメイン（本明細書ではE17とも呼ばれる）である。

【0777】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、核酸配列は、少なくとも1つのプロモーターを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのプロモーターは、構成的プロモーターまたは組織特異的プロモーターである。一実施形態では、プロモーターは、CAGまたは短縮型CAG（tCAG）プロモーターである。別の実施形態では、プロモーターは、EFSプロモーターである。一実施形態では、組織特異的プロモーターは、筋肉特異的プロモーターである。別の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、MHCK7プロモーターである。別の実施形態では、筋肉特異的プロモーターは、デスミンプロモーターである。一実施形態では、デスミンプロモーターは、全長デスミンプロモーターである。別の実施形態では、デスミンプロモーターは、短縮型デスミンプロモーターである。

【0778】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、RNAによりガイドされるRNase Casタンパク質またはガイドされないRNA結合性ポリペプチドは、第2のRNA結合性ポリペプチドと融合している第1のRNA結合性ポリペプチドである。一実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、RNAと会合する様式でRNAに結合することができる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、RNAを切断する様式でRNAと会合することができる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、RNase1、RNase4、RNase6、RNase7、RNase8、RNase2、RNase6PL、RNaseL、RNaseT2、RNase11、RNaseT2様、NOB1、ENDOV、ENDOG、ENDOD1、hFEN1、hSLFN14、hLACTB2、APEX2、ANG、HRSP12、ZC3H12A、RIDA、PDL6、NTHL、KIAA0391、APEX1、AGO2、EXOG、ZC3H12D、ERN2、PELO、YBEY、CPSF4L、hCG—
2002731、ERCC1、RAC1、RAA1、RAB1、DNA2、FLJ35220、FLJ13173、ERCC4、RNase1（K41R）、RNase1（K41R、D121E）、RNase1（K41R、D121E、H119N）、RNase1（H119N）、RNase1（R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N）、RNase1（R39D、N67D、N88A、G89D、R91D、H119N、K41R、D121E）、RNase1（R39D、N67D、N88A、G89D、R91D）、TENM1、TENM2、RNaseK、TALEN、ZNF638、およびhSMG6（PIN）からなる群から選択される。一実施形態では、第2のRNA結合性ポリペプチドは、ZC3H12Aからのヌクレアーゼドメイン（E17）である。一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、不活性化されている、RNAによりガイドされるRNase Casタンパク質である。

【0779】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるCUG標的化DM1組成物を含むベクターが、本明細書に開示される。一部の実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、ナノ粒子、ミセル、リポソーム、リポブックス、ポリマーソーム、ポリブックス、およびデンドリマーからなる群から選択される。一実施形態では、AAVベクターは、本明細書に開示されるCUG標的化DM1組成物を含む。一実施形態では、AAVベクターは、AAV9である。別の実施形態では、AAVベクターは、AAVrh.74である。一部の実施形態では、本明細書に開示されるベクター（単数または複数）を含む細胞が、本明細書に開示される。

10

20

30

40

50

【0780】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAを含む配列は、真核細胞においてgRNAを発現させることができるプロモーターをコードする配列をさらに含む。

【0781】

本開示の組成物の一部の実施形態では、真核細胞は、動物細胞である。一部の実施形態では、動物細胞は、哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、動物細胞は、ヒト細胞である。一部の実施形態では、ヒト細胞は、筋肉細胞である。

【0782】

本開示の組成物の一部の実施形態では、プロモーターは、構成的に活性なプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、RNAポリメラーゼの発現を駆動することができるプロモーターから単離されるまたはそれに由来する。一部の実施形態では、プロモーター配列は、Pol IIIプロモーターである。一部の実施形態では、プロモーター配列は、ヒトU6プロモーターから単離されるまたはそれに由来する。一部の実施形態では、プロモーターは、転移RNA (tRNA) の発現を駆動することができるプロモーターから単離されるまたはそれに由来する配列である。一部の実施形態では、プロモーターは、アラニンtRNAプロモーター、アルギニンtRNAプロモーター、アスパラギンtRNAプロモーター、アスパラギン酸tRNAプロモーター、システインtRNAプロモーター、グルタミンtRNAプロモーター、グルタミン酸tRNAプロモーター、グリシンtRNAプロモーター、ヒスチジンtRNAプロモーター、イソロイシンtRNAプロモーター、ロイシンtRNAプロモーター、リシンtRNAプロモーター、メチオニンtRNAプロモーター、フェニルアラニンtRNAプロモーター、プロリンtRNAプロモーター、セリンtRNAプロモーター、トレオニンtRNAプロモーター、トリプトファンtRNAプロモーター、チロシンtRNAプロモーター、もしくはバリンtRNAプロモーターから単離される、またはそれに由来する。一部の実施形態では、プロモーターは、バリンtRNAプロモーターから単離されるまたはそれに由来する。

【0783】

本開示の組成物の一部の実施形態では、gRNAのDR配列は、Cas13d DR配列である。

【0784】

本開示の組成物の一部の実施形態では、第1のRNA結合性タンパク質は、Cas9 CRISPR-Casタンパク質ではない、CRISPR-Casタンパク質を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性を含む。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、低下しているまたは阻害されている。一部の実施形態では、ネイティブなRNAヌクレアーゼ活性は、増加しているまたは誘導されている。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質および／または同族gRNAは、変異を含む。一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質のヌクレアーゼドメインは、変異を含む。一部の実施形態では、gRNAのDR配列は、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードする核酸、またはgRNAをコードする核酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、CRISPR-Casタンパク質をコードするアミノ酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む。一部の実施形態では、変異は、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも1つの必須アミノ酸残基の欠失を含む。一部の実施形態では、変異は、gRNAのDR配列における点変異である。

【0785】

一部の実施形態では、CRISPR-Casタンパク質は、VI型CRISPR-Casタンパク質である。一部の実施形態では、RNA結合性タンパク質は、Cas13ポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態では、RNA結合性タンパク質は、Cas13dポリペプチドまたはそのRNA結合性部分を含む。一部の実施形態

では、C R I S P R - C a s タンパク質は、ネイティブな R N A ヌクレアーゼ活性を含む。一部の実施形態では、ネイティブな R N A ヌクレアーゼ活性は、低下しているまたは阻害されている。一部の実施形態では、ネイティブな R N A ヌクレアーゼ活性は、増加しているまたは誘導されている。一部の実施形態では、C R I S P R - C a s タンパク質および／またはその同族 g R N A は、変異を含む。一部の実施形態では、C R I S P R - C a s タンパク質のヌクレアーゼドメインは、変異を含む。一部の実施形態では、変異は、C R I S P R - C a s タンパク質をコードする核酸にまたは g R N A をコードする核酸に存在する。一部の実施形態では、変異は、C R I S P R - C a s タンパク質のアミノ酸配列に存在する。一部の実施形態では、変異は、置換、挿入、欠失、フレームシフト、逆位、または転位を含む。一部の実施形態では、変異は、ヌクレアーゼドメイン、ヌクレアーゼドメイン内の結合性部位、ヌクレアーゼドメイン内の活性部位、またはヌクレアーゼドメイン内の少なくとも 1 つの必須アミノ酸残基の欠失を含む。一部の実施形態では、変異は、g R N A の D R 配列における点変異である。一実施形態では、変異型 D R 配列は、点変異を含む C a s 1 3 d D R 配列である。

10

【0786】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、ガイドされない R N A 結合性タンパク質は、R N A 結合活性のために多量体形成を必要としない。一部の実施形態では、ガイドされない R N A 結合性タンパク質は、多量体複合体の単量体ではない。一部の実施形態では、多量体タンパク質複合体は、R N A 結合性タンパク質を含まない。

20

【0787】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の標的配列に選択的に結合する。一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の第 2 の配列に対する親和性を含まない。一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、R N A 分子内の第 2 の配列に対して高い親和性を含まずそれを選択的に結合しない。

【0788】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A ゲノムまたは R N A トランスクリプトームは、R N A 分子を含む。

【0789】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、終点を含めて、2 アミノ酸から 1 3 0 0 アミノ酸の間を含む。

30

【0790】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A 結合性融合タンパク質は、終点を含めて、2 アミノ酸から 2 0 0 0 アミノ酸の間を含む。

【0791】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質をコードする配列は、核局在化シグナル (N L S)、核外輸送シグナル (N E S) またはタグをコードする配列をさらに含む。一部の実施形態では、核局在化シグナル (N L S) をコードする配列は、R N A 結合性タンパク質をコードする配列の N 末端に位置する。一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、タンパク質の C 末端に N L S を含む。一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質または系をコードする配列は、2 つの N L S または 2 つの N E S を含む。

40

【0792】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質をコードする配列は、第 1 の N L S をコードする第 1 の配列、および第 2 の N L S をコードする第 2 の配列をさらに含む。一部の実施形態では、第 1 の N L S または第 2 の N L S をコードする配列は、R N A 結合性タンパク質をコードする配列の N 末端に位置する。一部の実施形態では、R N A 結合性タンパク質は、タンパク質の C 末端に第 1 の N L S または第 2 の N L S を含む。一部の実施形態では、R N A 結合性組成物は、少なくとも 1 つのリンカーを含む。

50

【0793】

本開示の方法および／または組成物の一部の実施形態では、組成物は、第2のRNA結合性タンパク質をさらに含む。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、ヌクレアーゼドメインを含むまたはそれからなる。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAと会合する様式でRNAに結合する。一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質は、RNAを切断する様式でRNAと会合する。本開示の組成物の一部の実施形態では、第2のRNA結合性タンパク質をコードする配列は、RNAaseを含むまたはそれからなる。

【0794】

本明細書に開示される組成物のおよび／または組成物を含むベクターの製造方法も、本明細書に開示される。

【0795】

核酸配列が、少なくとも1つのプロモーターを含み、少なくとも1つのプロモーターが、構成的プロモーターまたは組織特異的プロモーターであり、少なくとも1つのプロモーターが、EFSプロモーターまたはtCAGプロモーターであり、組織特異的プロモーターが、筋肉特異的プロモーターであり、筋肉特異的プロモーターが、MHCK7プロモーターであり、および／または前記プロモーターのいずれかが、エンハンサーおよび／またはイントロンを含む、前記実施形態のいずれか。

【0796】

毒性標的RNAの発現レベルが、未処置毒性標的RNAの発現レベルの低下と比較して低下され、毒性標的RNAの発現レベルが、RCas9に基づく系で処置された毒性標的RNAの低下レベルと比較して低下され、低下のレベルが、1倍であるかまたはそれより大きく、低下のレベルが、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍であり、低下のレベルが、10倍であるかまたはそれより大きく、低下のレベルが、10倍～20倍の間である、前記実施形態のいずれか。

【0797】

核酸配列が、ヒト細胞においてgRNAを発現させることができるプロモーターを含み、プロモーターが、ヒトU6プロモーターであり、プロモーターが、転移RNA(tRNA)の発現を駆動することができるプロモーターから単離されたまたはそれに由来する配列であり、プロモーターが、アラニンtRNAプロモーター、アルギニンtRNAプロモーター、アスパラギンtRNAプロモーター、アスパラギン酸tRNAプロモーター、システインtRNAプロモーター、グルタミンtRNAプロモーター、グルタミン酸tRNAプロモーター、グリシンtRNAプロモーター、ヒスチジンtRNAプロモーター、イソロイシンtRNAプロモーター、ロイシンtRNAプロモーター、リシンtRNAプロモーター、メチオニンtRNAプロモーター、フェニルアラニンtRNAプロモーター、プロリンtRNAプロモーター、セリンtRNAプロモーター、トレオニンtRNAプロモーター、トリプトファンtRNAプロモーター、チロシンtRNAプロモーター、およびバリンtRNAプロモーターからなる群から選択され、gRNAのDR配列が、Cas13d DR配列であり、核酸配列が、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)、核外輸送シグナル(NES)またはタグをコードする配列をさらに含み、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)が、RNA結合性タンパク質をコードする配列のN末端に位置し、少なくとも1つの核局在化シグナル(NLS)が、RNA結合性タンパク質をコードする配列のC末端に位置し、核酸配列が、2つの核局在化シグナル(NLS)または2つの核外輸送シグナル(NES)をコードする配列をさらに含み、RNA結合性タンパク質または融合タンパク質が、少なくとも1つのリンカーを含む、前記実施形態のいずれかに記載の方法および組成物。

【0798】

(実施例1)

Cas13d系はDM1毒性CUGリピートを分解する材料

10

20

30

40

50

(実施例 2)

P U F 系は D M 1 毒性 C U G リピートを分解する

材料

プラスミド：C T G 9 6 0 (9 6 0 の C T G リピート)、T e t トランス活性化因子、R B P を発現する p c D N A 3 . 1

【0808】

トランスフェクション試薬：L i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0、o p t i - M E M、P B S、D M E M

【0809】

R N A 抽出キット：R N E A S Y P L U S (Q i a g e n)

【0810】

q S c r i p t (商 標) O n e - S t e p S Y B R (登 録 商 標) G r e e n q R T - P C R K i t、Q u a n t a b i o

方法

トランスフェクション、R N A 抽出、F I S H、および q R T - P C R 解析

【0811】

C U G リピート含有 R N A のノックダウンを評価するために、 5×10^4 個の C O S M 6 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、50 ng の D M P K - C T G 9 6 0 プラスミド (C U G - 9 6 0 発現がテトラサイクリン調節可能プロモーターエレメント (T R E) の制御下で駆動される場合)、25 ng の T e t トランス活性化因子 (t T A) プラスミド、および $1 \mu\text{g}$ の R B P (P U F) を用いてトランスフェクトした。細胞を O p t i - M E M (5 % F B S を含有する) 中の 100 ng/ml のドキシサイクリンとともに一晩インキュベートした。細胞を P B S で洗浄し、 100 ng/ml のドキシサイクリンを補充した完全 D M E M 培地中でさらに 24 時間インキュベートした。細胞を回収し、R N A を抽出し、q R T - P C R を行った。C U G 発現 $\Delta \Delta \text{CT}$ を計算し、ハウスキーピング遺伝子に対して正規化し、非標的化 (N T) 対照と比べて C U G 9 6 0 R N A ノックダウンを定量化した。

【0812】

P U F 構築物 (図 1 に C U G - f 1 および C U G - f 2 と表示されている) は、毒性配列 U G C U G C U G (配列番号 4 5 3) を標的とした。

【0813】

図 1 は、C U G 標的化 P U F - E 1 7 融合系が対照と比較して C U G 標的の $> 90\%$ を消失させることを実証する。

【0814】

図 2 は、R N A 蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (R N A - F I S H) によって解析して、P U F (C U G) - E 1 7 融合系が対照と比較して C U G リピート R N A の $> 90\%$ を消失させることを実証する。

【0815】

図 3 は、R C a s 9 系と比較した P U F (C U G) 系を示す。P U F (C U G) 系は、対照 N T と比較して C U G 標的の $> 90\%$ を消失させる効率的切断をもたらす。R C a s 9 で処置した細胞は、標的 C U G リピートの約 80% ノックダウンを示した。

【0816】

(実施例 3)

筋強直性ジストロフィー 1 型の処置のための R N A レベルでの伸長した C U G リピートの標的化 (分解および遮断機序)

本明細書に開示される R N A 標的化組成物 A 0 1 2 1 5 (分解のための C a s 1 3 d (C U G))、A 0 1 3 4 4 (分解のための P U F (C U G) - E 1 7)、および A 0 1 6 8 6 (遮断のための) を、A A V に基づくアプローチによって、全身性経路または筋肉内経路のどちらかによって送達した。例えば、筋強直性ジストロフィーの下記の当技術分野において認知されている動物モデルにおける A A V 9 に基づく送達のための P U F 標的化

10

20

30

40

50

CUG構築物を表53に示す。

【表53】

表53: AAV9に基づく送達のためのPUF標的化CUG構築物

タンパク質 のタイプ	エレメント	標的配列	PUFのアミノ酸配列
8PUF	N末端SV40 NLS; PUFとE17エンド ヌクレアーゼの間の リンカー (VDTANGS); C末端E17	UGCUGCUG (配列番号 453)	GRSRLLEDFRNNRYPNLQLREIAGHI MEFSQDQHGSRFIELKLERATPAERQ LVFNEILQAAYQLMVDVFGNYVIQK FFEFGSLEQKLALAERIRGHVLSLAL QMYGSYVIRKALEFIPSDQQNEMVR ELDGHVLKCVKDQNGSYVVEKCIEC VQPQSLQFIIDAFKQGVFALSTHPYG NRVIQRILEHCLPDQTLPILEELHQHT EQLVQDQYGSYVIRHVLEHGRPEDK SKIVAEIRGNVLVLSQHKFASNVVEK CVTHASRTERAVLIDEVCTMNDGPH SALYTMMKDQYANYVVQKMIDVAE PGQRKIVMHKIRPHIATLRKYTYGKH ILAKLEKYMKNGVDLG (配列番号 444)

10

【0817】

20

筋強直性ジストロフィーに関連する伸長されたCUGリピートを標的とするために、CUG標的化組成物をコードするDNAを有するベクターを、AAVベクターによって送達した。PUF(CUG)-E17、Cas13d(CUG)またはPUF(CUG)単独の発現がプロモーターによって駆動された(図4A~Cおよび図12A~B)。一部の態様では、短縮型CAG(tCAG)プロモーター(配列番号385)を使用した。一部の態様では、短いEF1-アルファ(EFS)プロモーター(配列番号520)を使用した。一部の態様では、UBBイントロンを有するEFSプロモーター(配列番号609)を使用した。

【0818】

30

AAV-9調製物を標準的な技法(トリプルトランスフェクション法)に従って生成し、IDX密度勾配超遠心法によって精製した。qPCRおよびカプシドELISAによって、AAVの力価を決定した。次に、上記のAAV9バージョンを、HSA-LR筋強直性ジストロフィー1型マウスに静脈内注射(150μLの総体積、 1×10^{12} vg)し、または前記マウスの前脛骨筋に注射(50μLの総体積、 2×10^{10} vg、 1×10^{11} vg)し、その後、毎日臨床観察を行った。マウスを注射後4wおよび12wの時点で殺した。RNA/タンパク質評価および遺伝子発現の変化のために、動物ごとに、前脛骨筋(IM注射の注射部位)、四頭筋、横隔膜、腓腹筋、心臓、脾臓、肝臓(代表部分、すなわち、葉の一部)、腸および腎臓の近位半分を収集し、個別に(対の臓器を除いて)クライオバイアルに入れ、液体窒素で瞬間凍結させた。全ての組織の残りの半分は、OCTに包埋し、凍結させた。筋肉切片を横断方式で切り取った。組織の残りの半分を使用して全RNAを調製した。

40

【0819】

4および12週の時点でマウスを殺する前に筋電図検査を行って、筋強直性ジストロフィー1型の生理学的表現型を回復させる点でのRNA標的化組成物の有効性の尺度として疾患関連筋強直(筋弛緩の異常)の回復を評価した。

【0820】

凍結組織からのRNA単離は、RNAeasyカラム(Qiagen)を用いて製造者のプロトコールに従って行った。Nanodrop分光光度計を使用してRNAの質および濃度を推定した。cDNA調製は、Superscript III(ThermoFisher)を使用しランダムプライマーを用いて製造者のプロトコールに従って行った

50

。qPCRおよびデジタルドロップレットPCR（ddPCR）を行って、2つのマウス群（RNA標的化組成物、ビヒクル）の中で組織におけるRNA標的化組成物のレベルを評価し、導入遺伝子発現の永続性を評価した。

【0821】

RNA蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を行って、伸長されたCUGリピートを消失させるまたは遮断する点でのRNA標的化組成物の有効性の尺度として筋肉切片におけるRNA凝集体の消滅を測定した。

【0822】

塩化物チャネルCln1およびMbnl1に対する抗体を用いる免疫蛍光検査を、筋強直性ジストロフィー1型分子病態の処置についてのRNA標的化組成物の有効性の尺度として行った。Cln1の再構成および核内Mbnl1の再分布は、筋強直性ジストロフィー1型分子病態回復を意味する。

【0823】

筋肉組織から単離したRNAからcDNAを調製した。選択的にスプライシングされたAtpt2a1のエクソン22、Cln1のエクソン7、BIN1のエクソン11に隣接するプライマーを用いてRT-PCRを行って、筋強直性ジストロフィー1型関連選択的スプライシングの回復を明らかにする。

【0824】

（実施例4）

dCas13dおよびCUG標的化ガイドRNAによる筋強直性ジストロフィー1型の処置のためのRNAレベルでの伸長したCUGリピートの標的化

ヒトU6プロモーター下のCUG標的化ガイドRNA（gRNA）と、エンドヌクレアーゼE17（ヒトZC3H112A遺伝子に由来する）に連結されたヌクレアーゼ失活dCas13d、またはヌクレアーゼ失活dCas13d（単独の）とをコードする単一の導入遺伝子を、ウイルスまたは非ウイルス手段によって、全身性経路または筋肉内経路のどちらかによって送達する。筋強直性ジストロフィーに関連する伸長されたCUGリピートを標的とするために、CUG標的化gRNAおよびdCas13d（CUG）をコードするDNAを有するベクターを、AAVベクターによって送達する。Cas13d（またはdCas13d）発現は、プロモーターによって駆動される（図4B、図4Cおよび図12B）。一部の態様では、短縮型CAG（tCAG）プロモーター（配列番号385）を使用した。一部の態様では、短いEF1-アルファ（EFS）プロモーター（配列番号520）を使用した。一部の態様では、UBBイントロンを有するEFSプロモーター（配列番号609）を使用した。

【0825】

AAV9調製物を標準的な技法（トリプルトランスフェクション法）に従って生成し、IDX密度勾配超遠心法によって精製した。qPCRおよびカプシドELISAによって、AAVの力価を決定した。次に、上記のAAV9バージョンを、HSA-LR筋強直性ジストロフィー1型マウスに静脈内注射（150μLの総体積、 1×10^{12} vg）し、または前記マウスの前脛骨筋に注射（50μLの総体積、 2×10^{10} vg、 1×10^{11} vg）し、その後、毎日臨床観察を行う。マウスを注射後4wおよび12wの時点で殺す。RNA／タンパク質評価および遺伝子発現の変化のために、動物ごとに、前脛骨筋（IM注射の注射部位）、四頭筋、横隔膜、腓腹筋、心臓、脾臓、肝臓（代表部分、すなわち、葉の一部）、腸および腎臓の近位半分を収集し、個別に（対の臓器を除いて）クライオバイアルに入れ、液体窒素で瞬間凍結させる。全ての組織の残りの半分は、OCTに包埋し、凍結させる。筋肉切片を横断方式で切り取る。組織の残りの半分を使用して全RNAを調製する。

【0826】

4および12週の時点でマウスを殺す前に筋電図検査を行って、筋強直性ジストロフィー1型の生理学的表現型を回復させる点での分解によるdCas13d（CUG）-E17の有効性または遮断によるdCas13d（CUG）の有効性の尺度として疾患関

10

20

30

40

50

連筋強直（筋弛緩の異常）の回復を評価する。凍結組織からのRNA単離は、RNAeasyカラム（Qiagen）を用いて製造者のプロトコールに従って行う。Nanodrop分光光度計を使用してRNAの質および濃度を推定する。cDNA調製は、Superscript II（ThermoFisher）を使用しランダムプライマーを用いて製造者のプロトコールに従って行う。qPCRおよびデジタルドロップレットPCR（ddPCR）を行って、2つのマウス群（Cas13dまたはdCas13dとともにCUG標的化RNA、ビヒクル）の中で組織におけるCas13d（またはdCas13d）およびgRNAのレベルを評価して、導入遺伝子発現の永続性を評価する。RNA蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を行って、伸長されたCUGリピートを消失させる点でのCUG標的化gRNA+Cas13d（またはdCas13d）の有効性の尺度として筋肉切片におけるRNA凝集体の消滅を測定する。塩化物チャンネルCln1およびMbnl1に対する抗体を用いる免疫蛍光検査を、筋強直性ジストロフィー1型分子病態の処置についてのgRNA+Cas13d（またはdCas13d）の有効性の尺度として行う。Cln1の再構成および核内Mbnl1の再分布は、筋強直性ジストロフィー1型分子病態回復を意味する。筋肉組織から単離したRNAからcDNAを調製する。選択的にスプライシングされたAtp2a1のエクソン22、Cln1のエクソン7、BIN1のエクソン11に隣接するプライマーを用いてRT-PCRを行って、筋強直性ジストロフィー1型関連選択的スプライシングの回復を明らかにする。

10

【0827】

（実施例5）

20

患者筋細胞およびHSA DM1マウス（上記）における分解または遮断によるCUG^exPRNAの用量依存的低減

筋強直性ジストロフィーI型（DM1）は、DMPK mRNAの3'非翻訳領域（UTR）におけるCUGマイクロサテライトリピート伸長（MRE）によって引き起こされる多臓器型の常染色体優性遺伝性障害である。以前に、本発明者らは、CRISPR/Cas9に基づくRNA標的化遺伝子治療には、初代患者細胞およびDM1マウスモデルにおいてDM1における反復トラクトから発現される毒性RNAを消失させる可能性があることを示した。あまり扱いやすくない、オフターゲット効果を低下または消失させるのにより適している、治療的MRE標的化戦略をさらに探究するために、本発明者らは、RNA標的化系：1）新規CRISPR/Cas13d（A01215）、2）ヒトZC3H112Aに由来するRNAエンドヌクレアーゼと連結された天然に存在するヒトPUM1タンパク質（PUF-E17）から得られたPUF RNA結合性タンパク質系（A01344）、および3）エンドヌクレアーゼを伴わないPUF RNA結合性タンパク質系（A01686）を、伸長されたDM1関連CUGリピートを切断（1および2）または遮断どちらかの標的とするように操作した。改変された、AAvrh74にパッケージングされた、Cas13dおよびPUF-E17は、DM1患者の筋細胞における核内CUG RNA凝集体を用量依存方式で低減させた。さらに、ユニタリーAAV9にパッケージングされたCas13d、PUF-E17およびPUF（遮断）を別々に筋肉内（IM）および静脈内（IV）注射によって成体（8～12週齢）HSA LR DM1マウスに送達した。本発明者らは、全てのRNA標的化系のIM注射後4週間の時点での筋電図検査から、用量依存的導入遺伝子発現、DM1関連選択的スプライシングの修正、および筋強直の軽減を報告する。予想通り、Cas13dおよびPUF-E17によるRNA凝集体の低減およびスプライシングの改善は、CUG RNAレベルの低下（>50%）を伴った。要するに、本発明者らは、DMPKにおけるMREを有効に標的化することができ、DM1の分子的小および臨床的特徴を改善することができる、異なる機序のアプローチ（分解および遮断）を示す。図6～12。

30

40

【0828】

（実施例6）

NHP研究における忍容性および導入遺伝子発現

標的組織における忍容性および導入遺伝子発現レベル（生体内分布）を評価するために

50

筋肉（骨格筋、平滑筋および心筋）特異的プロモーターの制御下の上記のRNA標的化組成物（A01215、A01344、およびA01686）をコードするAAV9を用いて非ヒト霊長類（NHP）研究を行っている。RNA標的化組成物。CUG標的化組成物をコードするDNAを有するベクターをAAV9ベクターによって送達した。PUF（CUG）-E17、Cas13d（CUG）またはPUF（CUG）単独の発現がプロモーターによって駆動される（図4A～Cおよび図12A～B）。一部の態様では、デスミンプロモーター（全長デスミン配列番号568または短縮型デスミン配列番号569）を使用する。

参照による組み込み

【0829】

あらゆる相互参照されるまたは関連する特許または出願を含めた、本明細書において引用されているあらゆる文書は、明白に排除されるまたは他のやり方で限定される場合を除き、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いずれの文書の引用も、それが本明細書に開示されるもしくは具体化されるあらゆる発明に対して先行技術であること、または、単独で、もしくは任意の他の参考文献（複数可）との任意の組合せで、あらゆるそのような発明を教示、示唆もしくは開示するものであることを認めるものではない。さらに、本文書における用語のいずれかの意味または定義が参照により組み込まれる文書における同じ用語のいずれかの意味または定義と矛盾する範囲では、本文書におけるその用語に割り当てられた意味または定義が支配するものとする。

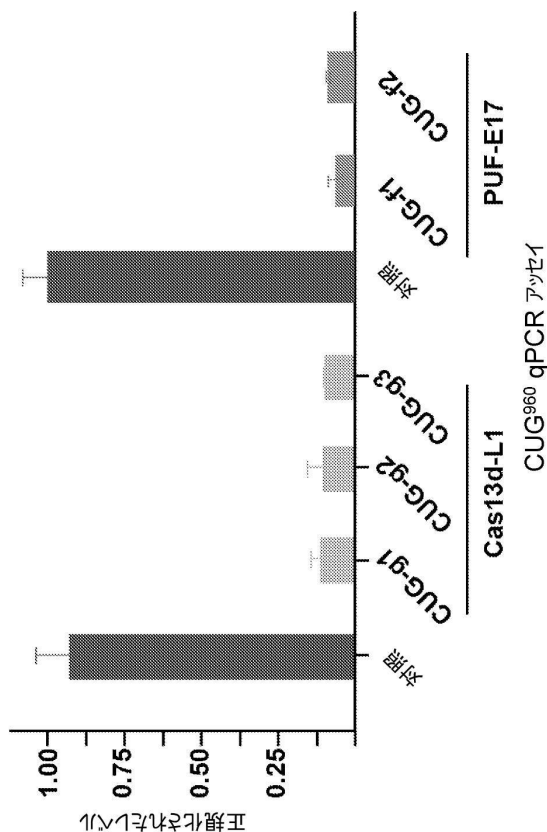
他の実施形態

【0830】

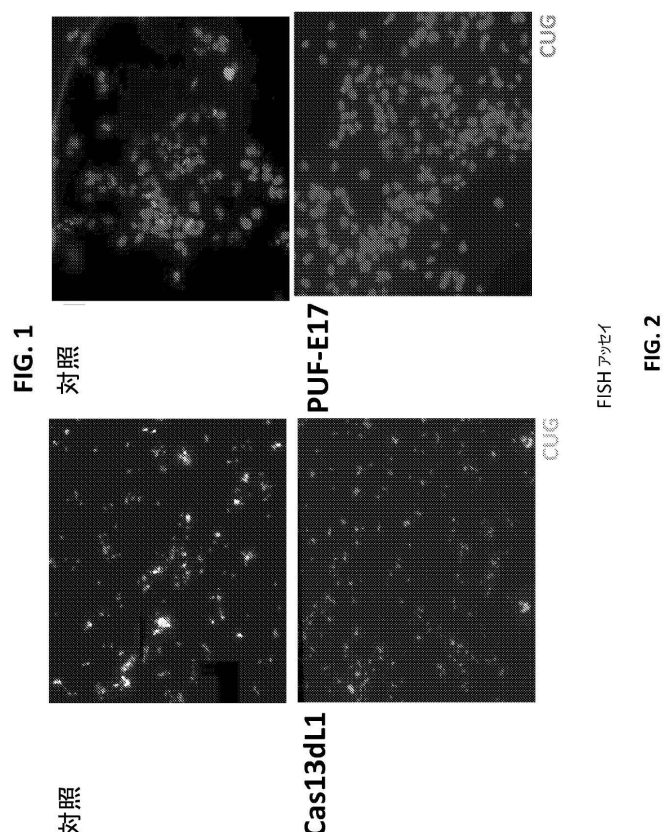
本開示の特定の実施形態を例示し、記載したが、種々の他の変化および改変を本開示の主旨および範囲から逸脱することなく行うことができる。添付の特許請求の範囲は、本開示の範囲内に入るそのような変化および改変の全てを包含する。

【図面】

【図1】



【図2】



10

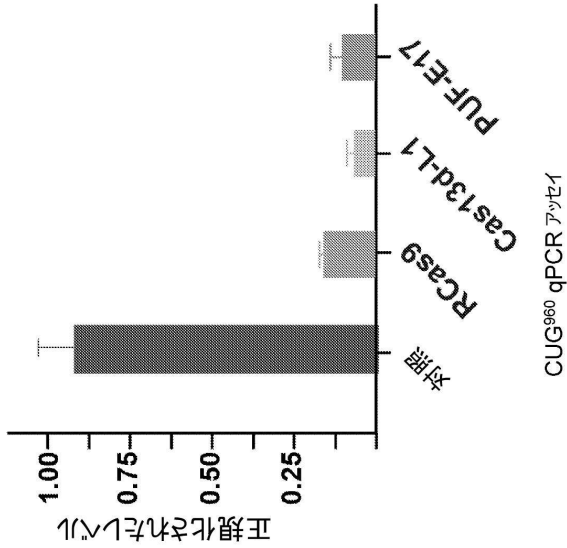
20

30

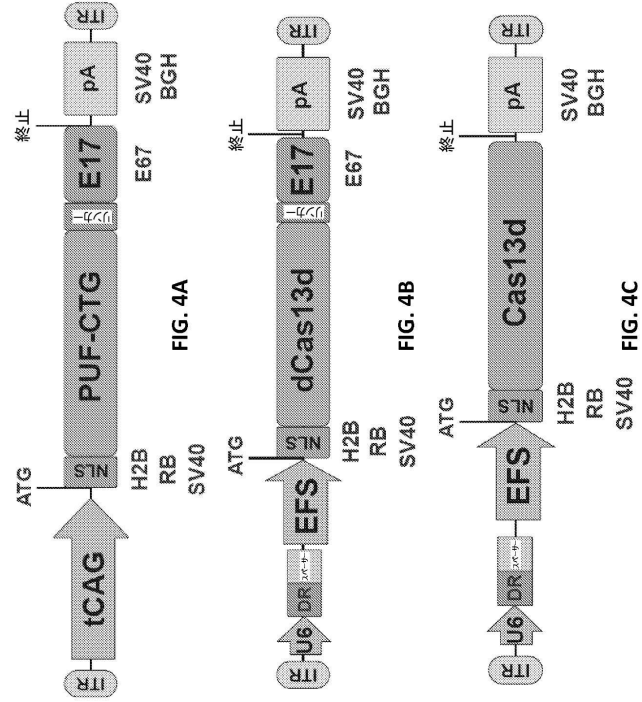
40

50

【図 3】



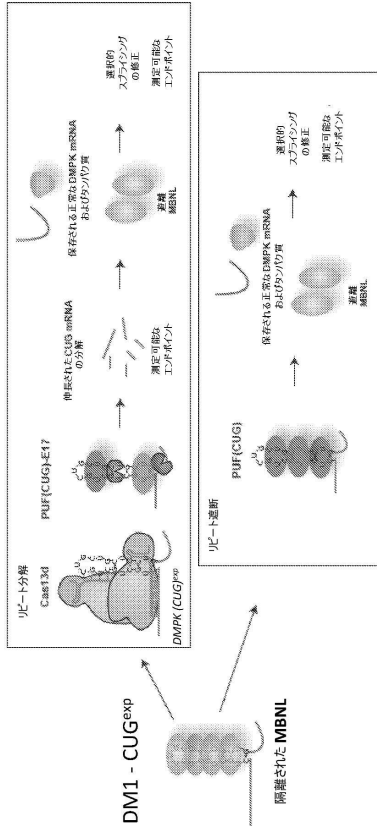
【図 4】



【図 5】

1	A000BF	11	
1	CU	FUKI	WUWVW

【図 7】

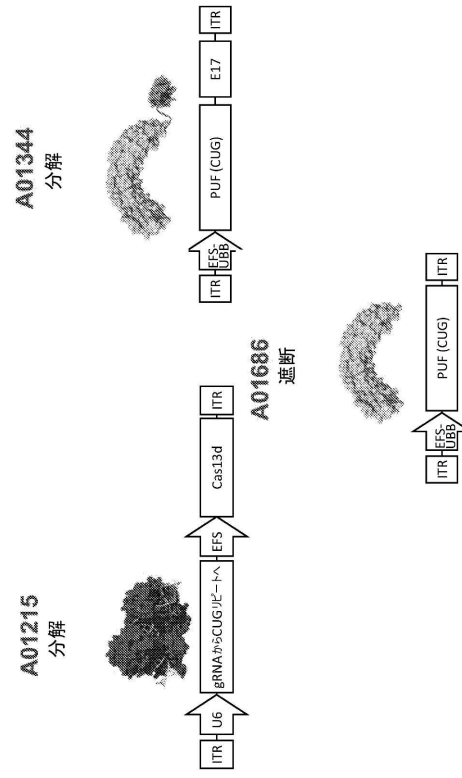


リピート分解: Cas13d-CUGおよびPUF(CUG)-E17は、伸長されたCUGリピートに結合し、毒性RNAを破壊する。これは、核内RNA凝集体のクリアランスおよびMBNL1の放出につながる。遊離 MBNL1は、正常に機能して、選択的スプライシングを調節して、DM1の疾患関連ミスプライシングおよびミスプライス関連機能障害を回復させる。

リピート遮断: PUF(CUG)は、伸長されたCUGに結合し、リピートを遮断し、その結果、MBNL1が放出される。遊離 MBNL1は、正常に機能して、選択的スプライシングを調節して、DM1の疾患関連ミスプライシングおよびミスプライス関連機能障害を回復させる。

FIG. 7

【図 8】



A01215 - 同族 CUG 標的化 gRNA を有する Cas13d (以前に発露された Cas13d オルソログではない)
A01344 - 反復 CUG RNA を標的とし、それを切断するように操作した、およびヒトエンドヌクレアーゼドメイン(E17)と融合した、PUF (ヒト PUM1 由来) タンパク質
A01686 - 反復 CUG RNA を標的とし、それと結合するように操作した、PUF (ヒト PUM1 由来) タンパク質

FIG. 8

【図 9】

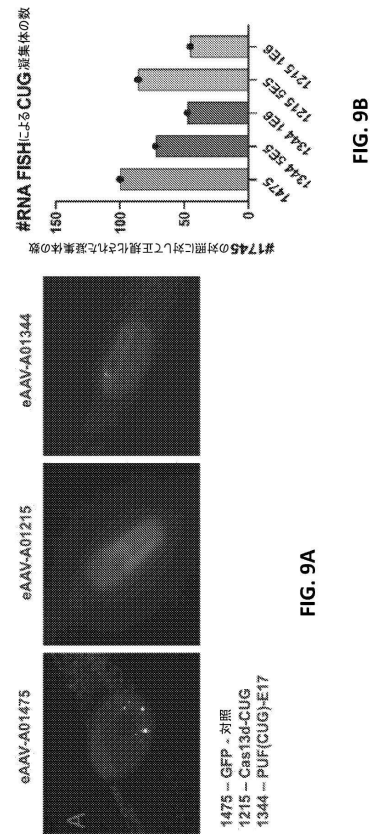


FIG. 9A

FIG. 9B

【図 10 - 1】

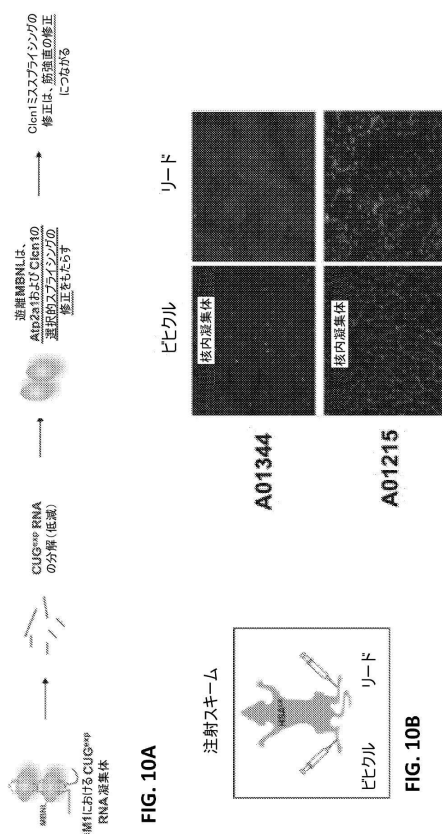


FIG. 10A

FIG. 10B

FIG. 10C

10

20

30

40

50

【図 1 0 - 2】

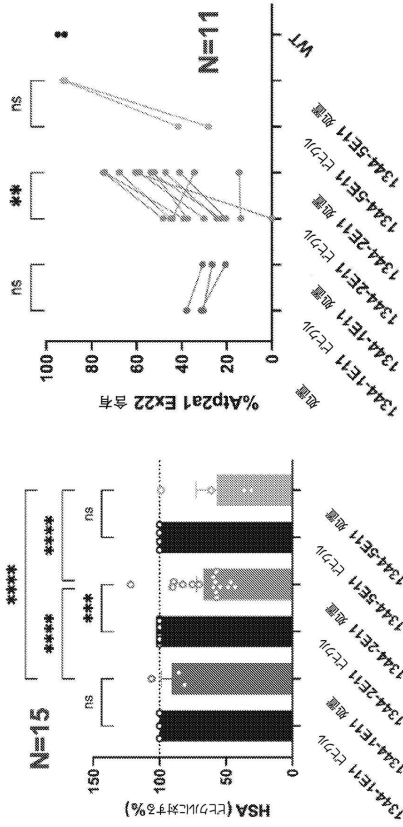


FIG. 10E

FIG. 10D

【図 1 0 - 3】

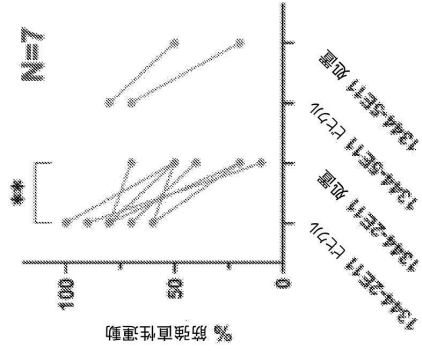
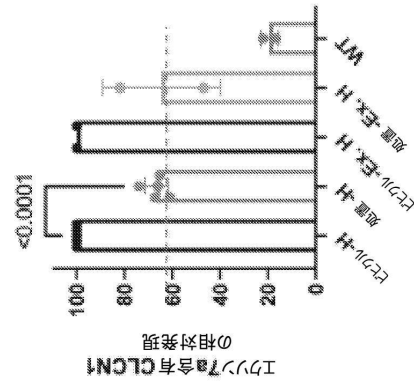


FIG. 10G

FIG. 10F



【図 1 1 - 1】

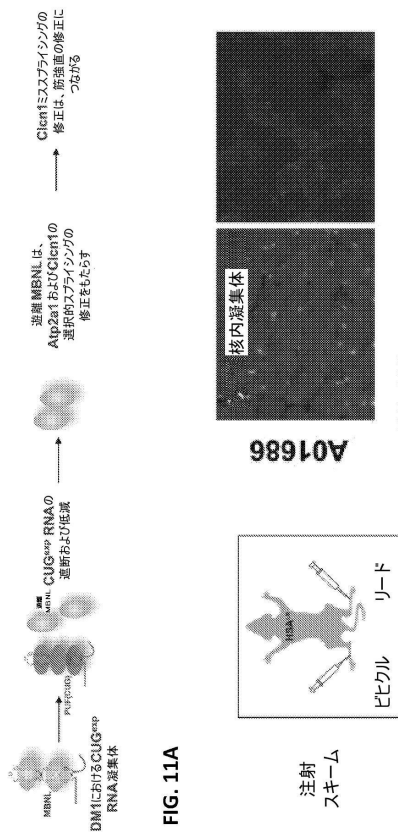
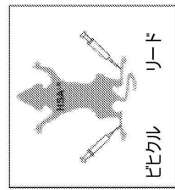


FIG. 11A

FIG. 11B



A01686

注射

スキーム

【図 1 1 - 2】

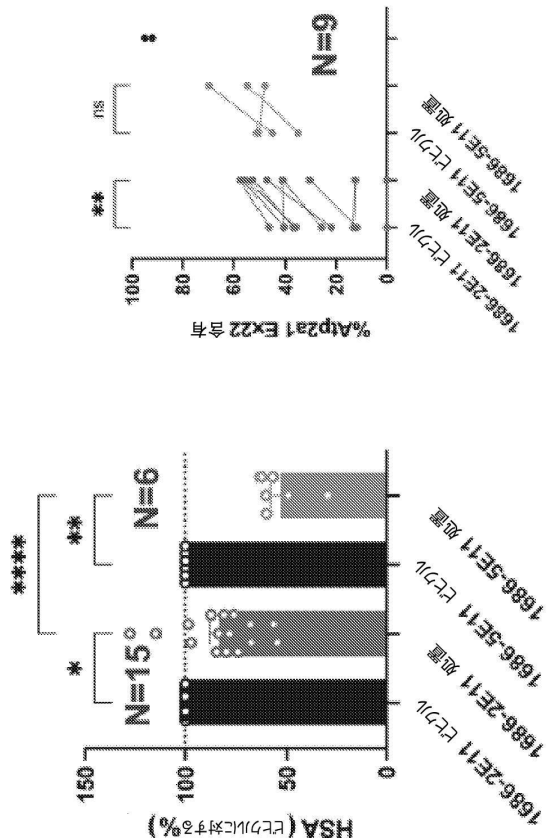
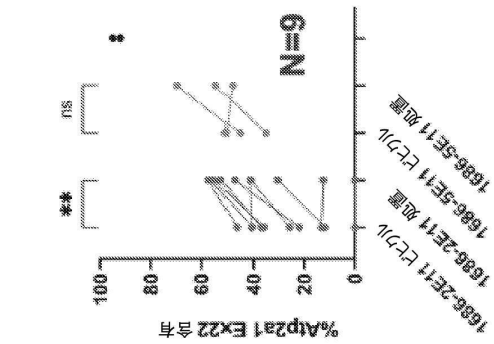
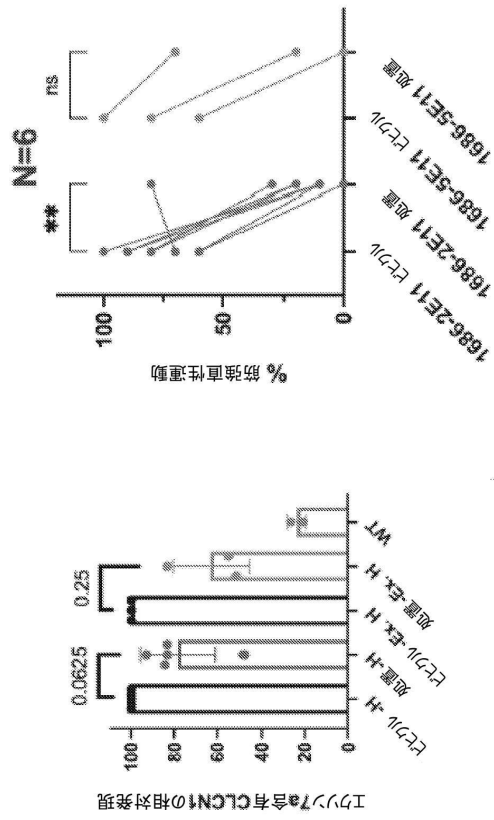


FIG. 11D

FIG. 11E



【図 1 1 - 3】



【図 1 2】

FIG. 11G

FIG. 11F

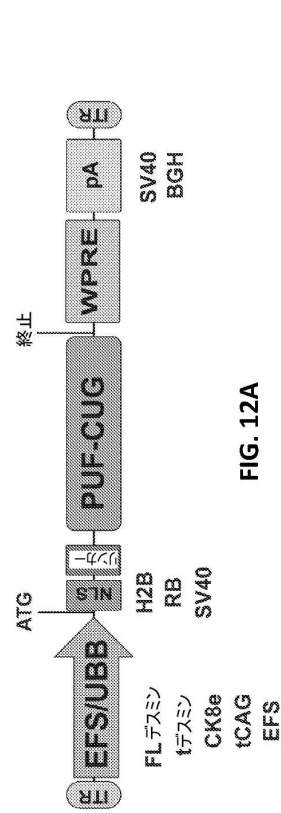


FIG. 12A

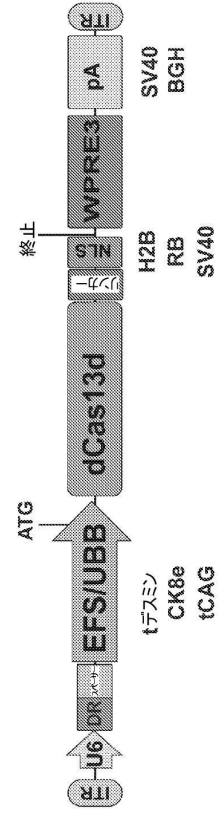


FIG. 12B

【配列表】

2023551874000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/061490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/46 A61P21/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/071718 A1 (NELLES DAVID A [US] ET AL) 5 March 2020 (2020-03-05) paragraphs [0015], [0023], [0024], [0133], [0285] - [0287]; claims 1-20 the whole document	1-51
A	CHEN ET AL: "Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on Caenorhabditis elegans", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM NL, vol. 352, no. 3, 12 December 2006 (2006-12-12), pages 774-779, XP005725108, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2006.11.102 the whole document Relationship between CUG repeats and DM1	1-51

☒ 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

21 March 2022

Date of mailing of the international search report

28/03/2022

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Sprinks, Matthew

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/061490

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/061490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATARZYNA P. ADAMALA ET AL: "Programmable RNA-binding protein composed of repeats of a single modular unit", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 113, no. 19, 10 May 2016 (2016-05-10), pages E2579-E2588, XP055755720, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1519368113 the whole document PUMBY-RNA interactions -----	1-51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/061490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020071718 A1	05-03-2020	AU 2019280990 A1	28-01-2021
		CA 3102779 A1	12-12-2019
		CN 112930395 A	08-06-2021
		EP 3802812 A1	14-04-2021
		JP 2021526858 A	11-10-2021
		KR 20210058806 A	24-05-2021
		SG 11202012004S A	28-01-2021
		US 2020071718 A1	05-03-2020
		US 2020123569 A1	23-04-2020
		US 2021047654 A1	18-02-2021
		WO 2019236982 A1	12-12-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	
(32)優先日 令和3年11月12日(2021.11.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関		
米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		
弁護士 山本 健策		
(72)発明者 ネルズ, デイビッド エー.		
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5, スイート 2 0 0, ロックアネイビオ, インコーポレイテッド 気付		
(72)発明者 バトラ, ランジャン		
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5, スイート 2 0 0, ロックアネイビオ, インコーポレイテッド 気付		
(72)発明者 ロス, ダニエラ		
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5, スイート 2 0 0, ロックアネイビオ, インコーポレイテッド 気付		
(72)発明者 ジソーリス, ディミトリオス		
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5, スイート 2 0 0, ロックアネイビオ, インコーポレイテッド 気付		
(72)発明者 タ, アンジェリー		
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ジョン ホブキンズ コート 3 5 4 5, スイート 2 0 0, ロックアネイビオ, インコーポレイテッド 気付		
F ターム (参考) 4B065 AA90X AA95X AB01 BA02 CA44		
4C084 AA13 MA13 MA16 MA17 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA941 ZA942		
4C087 AA01 AA02 CA12 MA13 MA16 MA17 MA52 MA56 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA94		
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA11 DA89 EA20 FA74		