

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-543966

(P2024-543966A)

(43)公表日 令和6年11月26日(2024.11.26)

(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	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10		
C 1 2 N	9/78 (2006.01)	C 1 2 N	9/78		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全65頁) 最終頁に続く					
(21)出願番号	特願2024-532454(P2024-532454)	(71)出願人	591100596		
(86)(22)出願日	令和4年11月30日(2022.11.30)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ		
(85)翻訳文提出日	令和6年7月29日(2024.7.29)		ンテ ドゥ ラ ルシエルシュ メディカル		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/083904		フランス国、エフ - 7 5 0 1 3 パリ、		
(87)国際公開番号	WO2023/099591		リュ・ドゥ・トルビアク 1 0 1		
(87)国際公開日	令和5年6月8日(2023.6.8)	(71)出願人	591140123		
(31)優先権主張番号	21306681.4		アシスタンス ピュブリク - オピトー ド		
(32)優先日	令和3年12月1日(2021.12.1)		ゥ パリ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ASSISTANCE PUBLIQUE		
			- HOPITAUX DE PARIS		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(71)出願人	515028470		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(フォンダシオン・イマジネ		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A		FONDATION IMAGINE		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR				
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサーの + 5 5 k b 領域を編集することにより胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法。

(57)【要約】

胎児ヘモグロビンの再活性化は、鎌状赤血球症及びサラセミア患者の処置における重大な目標のままである。いくつかのゲノム編集戦略が、ヘモグロビン症のための潜在的な治療として胎児 グロビンの発現を再活性化することを目標として、開発されてきた。B C L 1 1 A は、グロビンの主要なリプレッサーの1つである。D S B 誘導性毒性を回避するために、赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサー、具体的には A T F 4 結合部位を、B C L 1 1 A 発現を下方調節し、H b F を再活性化するために、C B E 及び A B E 媒介性塩基編集アプローチを使用して標的化することができる。ここで、本発明者らは、C B E 及び A B E を利用して、S C D H S P C における A T F 4 結合部位を分析し、エンハンサー活性における変化、B C L 1 1 A 下方調節、ならびに継続的に、H b F 再活性化及び鎌状化表現型レスキューを誘導する重大な塩基変換を同定した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

真核細胞における胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法であって、前記真核細胞を、(a)少なくとも1つの塩基編集酵素及び(b)前記塩基編集酵素を、赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサーの + 5 5 kb 領域中の少なくとも1つの標的配列にガイドするための少なくとも1つのガイド R N A 分子からなる遺伝子編集プラットフォームと接触させ、それにより、B C L 1 1 A の発現を抑制し、その後、グロビンの発現を増加させるために、前記領域中の A T F 4 結合部位を編集及び破壊する工程を含む方法。

【請求項 2】

前記真核細胞が、造血前駆細胞、造血幹細胞 (H S C)、多能性細胞 (即ち、胚性幹細胞 (E S) 及び人工多能性幹細胞 (i P S)) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記塩基編集酵素がニッカーゼ、より具体的には C a s 9 ニッカーゼを含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ニッカーゼが、配列番号 3 又は配列番号 4 において示されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記塩基編集酵素がシチジン・デアミナーゼ又はアデノシン・デアミナーゼである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記塩基編集酵素が、A B E - S p R Y (配列番号 1 8)、C B E - S p R Y (配列番号 1 7)、A B E 8 e (配列番号 3 7)、A B E 8 e - S p R Y (配列番号 3 8)、A B E 8 e - N R C H (配列番号 3 9)、及び N G - A B E 8 e (配列番号 4 0) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ガイド R N A が前記 A T F 4 結合部位を標的化し、前記部位を編集し、このように、その結合部位への A T F 4 の結合を破壊する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び以下を導入するために適切な少なくとも1つのガイド R N A 分子：

- 配列番号 4 5 の第 1 のシチジン残基における1つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
 - 配列番号 4 5 の第 2 のシチジン残基における1つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
 - 配列番号 4 5 の第 3 のシチジン残基における1つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
 - 第 4 のシチジン配列番号 4 5 における1つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C)
- を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び前記 A T F 4 結合部位の + 5 5 C B E I 編集プロファイルを生成するために適切な少なくとも1つのガイド R N A 分子 (即ち、T T G T A T T A T T T (配列番号 3 2)) を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び前記 A T F 4 結合部位において + 5 5 C B E I I 編集プロファイルを生成するために適切な少なくとも1つのガイド R N A 分子 (即ち、T T G C A T T A T T T (配列番号 3 3)) を含

50

む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び以下を導入するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子：

- 配列番号 4 5 (T T G C A T C A T C C) における第 1 のアデニン残基における 1 つの A > G 変異及び / 又は
- 配列番号 4 5 (T T G C A T C A T C C) における第 2 のアデニン残基における 1 つの A > G 変異、を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び前記 A T F 4 結合部位において + 5 5 A B E I I プロファイルを生成するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子 (T T G C A T C G T C C (配列番号 3 5)) を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び前記 A T F 4 結合部位において + 5 5 A B E I I I プロファイルを生成するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子 (T T G C G T C G T C C (配列番号 4 6)) を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ガイド RNA が、表 1 から選択される配列を標的化する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) A B E - S p R Y 又は C B E - S p R Y である塩基編集酵素及び b) 及び表 1 又は表 4 中で選択された 1 つの配列を標的化する少なくとも 1 つのガイド RNA 分子を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記遺伝子編集プラットフォームが、a) 塩基編集酵素及び b) 及び表 4 中に記載される組み合わせに従って選択される少なくとも 1 つのガイド RNA 分子を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記遺伝子編集プラットフォームが、前記赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサーの + 5 5 kb 領域中の複数の配列を標的化するように設計された複数のガイド RNA 分子を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 8】

前記遺伝子編集プラットフォームの異なる成分が、RNA コード化システムの使用を通じて細胞の集団に提供される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法により得られた真核細胞の集団の治療有効量を移植することを含む、それを必要とする対象において胎児ヘモグロビンレベルを増加させるための方法。

40

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法により得られた真核細胞の集団の治療有効量を移植することを含む、それを必要とする対象においてヘモグロビン症を処置する方法。

【請求項 2 1】

前記ヘモグロビン症が鎌状赤血球症又はサラセミアである、請求項 2 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

発明の分野：

本発明は、医学の分野、特に血液学の分野に関する。

【0002】

発明の背景：

ヘモグロビン症、サラセミア及び鎌状赤血球症（SCD）は、グロビン遺伝子座における変異により起こされる単一遺伝子性疾患で、成人ヘモグロビン（Hb）の合成又は構造に影響を及ぼす。サラセミアは、成人ヘモグロビン（HbA）四量体中に含まれるグロビン鎖の生成を低下（+）又は消失（0）させるグロビン遺伝子（HBB）遺伝子座における変異により起こされ、非共役グロビン鎖の沈殿、赤血球細胞死、及び重度の貧血に導く（Taher et al., 2018）。SCDでは、HBB遺伝子におけるA>T変異は、グロビン鎖（S）の位置6でのグルタミン酸についてのバリンの置換を起こし、それが鎌状ヘモグロビン（HbS）の脱酸素誘導性重合について関与している。この主要な事象は、赤血球（RBC）鎌状化、溶血、血管閉塞性の急性発作、多臓器損傷を起こし、しばしば、重度に低下した平均寿命に関連付けられる（Piel et al., 2017; Kata et al., 2018）。

10

【0003】

ヘモグロビン症についての唯一の決定的な治療法は、HLA適合ドナーからの同種造血幹細胞（HSC）の移植であって、患者の<30%に対して利用可能な選択肢である（Chandrakasan and Malik, 2014）。自家遺伝子改変HSCの移植に基づく遺伝子治療アプローチは、適合ドナーを欠いている患者のための処置選択肢として研究されてきた（Cavazzana et al., 2017）。ゲノム編集技術は、直接的な遺伝子修正に基づき、ヘモグロビン症のための治療アプローチを開発するために活用されている。これらのアプローチは、デザイナーヌクレアーゼ、例えば特定のゲノム標的に相補的な単一ガイドRNA（gRNA）を介してDNA二本鎖切断（DSB）を誘導するCRISPR/Cas9システムなどを使用する（Cavazzana et al., 2017）。DSBは、野生型配列を含むドナーDNAテンプレートを提供することにより、相同指向修復（HDR）を介して修復することができる。しかし、HDR媒介性遺伝子修正は、HSCにおいて不十分に効率的である。

20

【0004】

ヘモグロビン症の臨床歴は、サラセミア及びSCDの両方の重症度が、成人期における胎児性グロビンの合成により軽減されることを示す（Forget, 1998）。胎児ヘモグロビン（HbF）は、サラセミアにおけるHbA欠乏について補償し、グロビンは、変異鎌状鎖を置換することにより、SCDにおいて強力な抗鎌状化効果を発揮する（Cavazzana et al., 2017）。特に、BCL11Aにおける一塩基多型（SNP）は、成人期におけるHbFの上昇発現に関連付けられてきた（Canver et al., 2015）。BCL11Aは、HBG1/2の主要なリプレッサーの1つである。BCL11Aを完全に不活化することを目的とした試験によって、それが、リンパ系発生及び重要なHSC機能（Liu et al., 2003; Yu et al., 2012; Guda et al., 2015）ならびにヒトRBC除核（Chang et al., 2017）に有害な影響を及ぼすことが示された。逆に、その赤血球特異的エンハンサーの標的化を通じた正確なBCL11A下方調節は、有害効果を伴うことなくグロビンを抑制解除することができる（Wu et al., 2019）。いくつかのゲノム編集戦略が、サラセミア及びSCDの両方のための潜在的な治療として胎児グロビンの発現を再活性化する目標を伴い、患者の造血幹/前駆細胞（HSPC）における欠失又は挿入の生成を介したトランス調節エレメントの破壊及びそれらの赤血球系後代におけるHbF発現の再活性化に基づいて開発されている。赤血球特異的BCL11Aエンハンサー（+58kb及び+55kb領域）内のGATA1及びATF4アクチベーター結合部位（BS）のCRISPR/Cas9破壊によって、赤血球細胞株及び初代HSPCにおけるHbF発現が効率的に再活性化される（Wu et al., 2019; Huang et al., 2020）。

30

40

【0005】

50

H S C が D N A D S B に対して高度に感受性であることは注目に値する (Milyavsk y et al., 2010) - 特に複数のオンターゲット又は同時のオンターゲット及びオフターゲット事象の場合。高度に特異的な g R N A が使用される場合でさえ、ヒト H S P C の C a s 9 / g R N A 処理によって、アポトーシスに導き得る D N A 損傷応答が誘導される (Cromer et al., 2018)。C R I S P R / C a s 9 は、P 5 3 依存的な細胞毒性及び細胞周期停止を起こし、機能的な P 5 3 経路を伴う細胞のネガティブ選択をもたらし得る (Haapaniemi et al., 2018)。さらに、いくつかのオンターゲット D S B、同時のオンターゲット及びオフターゲット D S B、又はさらに単一のオンターゲット D S B の生成は、欠失、逆転、及び転座のリスクに関連付けられる (Kosicki et al., 2018)。それ故に、D S B 誘導性 D N A 修復よりむしろ、正確な塩基編集に基づくヘモグロビン症についての新規の、効果的な及び安全な治療戦略の開発が優先的であった。塩基エディターの基本成分は、触媒的に無効化された C a s 9 ヌクレアーゼ及びデアミナーゼである；これらは最終的に C - G から T - A 又は A - T から G - C への変換 (それぞれ C B E 及び A B E について) を産生する (Rees and Liu, 2018)。塩基編集アプローチによって、実質的に D S B の非存在において正確な D N A 修復が可能となり、このように、D S B 誘導性アポトーシス、D N A の大部分の転座及び挿入又は欠失のリスクが排除される。重要なことに、塩基編集は静止細胞において生じ、真の H S C が、この新規技術を使用して遺伝的に改変され得ることを示唆しており (Yeh et al., 2018)、N H E J により誘導される不均一で予測不可能な変異誘発と比較して、均一で予測可能な塩基変化をもたらす。塩基編集は、ヘモグロビン症の原因となる変異を修正するために利用されてきた (Antoniou et al., 2021 ; Newby et al., 2021)。しかし、H b F 再活性化を誘導することは、特定の疾患を起こす変異に関係なく、全ての患者に適用することができる普遍的なアプローチを表す (Zeng et al., 2020 ; Antoniou et al., 2021)。

10

20

【 0 0 0 6 】

発明の概要：

本発明は、特許請求の範囲により定義される。特に、本発明は、真核細胞における胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法、及びヘモグロビン症の処置のためのその使用に関する。

【 0 0 0 7 】

発明の詳細な説明：

D S B 誘導性毒性を回避するために、赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサー、具体的には A T F 4 結合部位を、B C L 1 1 A 発現を下方調節し、H b F を再活性化するために、C B E 及び A B E 媒介性塩基編集アプローチを使用して標的化することができる。ここで、本発明者らは、C B E 及び A B E を活用して、S C D H S P C における A T F 4 結合部位を精査し、エンハンサー活性における変化、B C L 1 1 A 下方調節、ならびに継続的に、H b F 再活性化及び鎌状化表現型レスキューを誘導する重大な塩基変換を同定した。

30

【 0 0 0 8 】

定義：

本明細書中で使用される場合、用語「ヘモグロビン症」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、個体の任意のヘモグロビンの構造又は機能における任意の欠損を指し、任意の変異、例えば通常の又は標準的な状態と比較して、産生されるヘモグロビンの量における低下を起こす、H B B 遺伝子のコード領域における欠失変異もしくは置換変異、又はそのような遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーにおける変異、もしくはその欠失などにより起こされる、ヘモグロビンの一次、二次、三次又は四次構造における欠損を含む。

40

【 0 0 0 9 】

本明細書中で使用される用語「鎌状赤血球症」は、当技術分野における一般的な意味を有し、グロビン遺伝子における変異からもたらされ、異常な、強固な、鎌状形態を呈する赤血球により特徴付けられる、常染色体劣性遺伝性血液障害の一群を指す。それらは、グ

50

ルタミン酸が、ペプチドのアミノ酸位置6でのバリンにより置き換えられている グロビン鎖バリエーションをコードする S グロビン遺伝子の存在により定義される：Hb 四量体 (Hb S、鎌状Hb) における S グロビンの組み入れは、Hb 重合に、及び臨床表現型に導く。この用語は、鎌状赤血球貧血 (Hb S S)、鎌状ヘモグロビンC疾患 (Hb S C)、鎌状ベータプラスサラセミア (Hb S / +)、又は鎌状ベータゼロサラセミア (Hb S / 0) を含む。

【0010】

本明細書中で使用される場合、用語「サラセミア」は、正常なヘモグロビン四量体タンパク質の産生不足及び遊離の不对 グロビン鎖の沈殿をもたらす、グロビンポリペプチド鎖に対する 様グロビンポリペプチド鎖の変化した比率に起因するヘモグロビン異常症を指す。

10

【0011】

本明細書中で使用される場合、用語「造血幹細胞」又は「HSC」は、自己複製し、血液細胞の前駆体に分化する能力を有する血液細胞を指す。これらの前駆細胞は、自己複製できない、成熟した血液細胞に分化しなければならない未熟な血液細胞である。造血幹前駆細胞は、多くの表現型、例えば Lin - CD34 + CD38 - CD90 + CD45RA -、Lin - CD34 + CD38 - CD90 - CD45RA -、Lin - CD34 + CD38 + IL - 3alloCD45RA -、及び Lin - CD34 + CD38 + CD10 + (Daley et al., Focus 18:62-67, 1996; Pimentel, E., Ed., Handbook of Growth Factors Vol. III: Hematopoietic Growth Factors and Cytokines, pp. 1-2, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1994)などを呈する。骨髓微小環境内では、幹細胞が自己複製し、生涯を通じて全ての成熟血液細胞を生み出す造血幹細胞の継続的な産生を維持する。一部の実施形態では、造血前駆細胞又は造血幹細胞は、末梢血細胞から単離される。

20

【0012】

本明細書中で使用される場合、用語「末梢血球」は、血液の循環プール内に見出される、赤血球、白血球、及び血小板を含む血液の細胞成分を指す。一部の実施形態では、真核細胞は骨髓由来幹細胞である。

【0013】

本明細書中で使用される場合、用語「骨髓由来幹細胞」は、骨髓中に見出される幹細胞を指す。幹細胞は、多能性能力を持つ付着性間質細胞型として、又は血液細胞に分化することができる造血幹細胞を同定するCD34もしくはCD45細胞表面タンパク質を発現する細胞として、骨髓中に存在し得る。

30

【0014】

本明細書中で使用される場合、用語「動員」又は「幹細胞動員」は、動員薬剤を用いた処理後の幹細胞の、それらの常在組織又は臓器から末梢血への動員を含む過程を指す。この過程は、損傷及び炎症の間でのストレス信号への応答における、組織又は臓器からの幹細胞の生理学的放出の増強を模倣する。動員過程の機構は、投与される動員薬剤の種類に依存する。一部の動員薬剤は、それらの微小環境の細胞又は組織への幹細胞の付着を防止するアゴニスト又はアンタゴニストとして作用する。他の動員薬剤は、幹細胞とそれらの付着部位の間の接着分子又は支持構造を切断するプロテアーゼの放出を誘導する。

40

【0015】

本明細書中で使用される場合、用語「動員薬剤」は、幹細胞の、それらの常在組織又は臓器、例えば、骨髓 (例、CD34 + 幹細胞) 及び脾臓 (例、Hox11 + 幹細胞) から末梢血中への動員を増強するように作用する広範囲の分子を指す。動員薬剤は、化学療法薬物、例えば、シクロホスファミド及びシスプラチンなど；サイトカイン、及びケモカイン、例えば、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、幹細胞因子 (SCF)、Fms 関連チロシンキナーゼ3 (flt-3) リガンド、間質細胞由来因子1 (SDF-1)；ケモカイン (C-Cモチーフ) 受容体1 (CCR1) のアゴニスト、例えばケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド3 (

50

CCL3、また、マクロファージ炎症性タンパク質-1 (Mip-1)として公知である) ; ケモカイン (C-X-Cモチーフ)受容体1 (CXCR1)及び2 (CXCR2)のアゴニスト、例えばケモカイン (C-X-Cモチーフ)リガンド2 (CXCL2) (また、成長関連癌遺伝子タンパク質-として公知である) (Gro-)、及びCXCL8 (また、インターロイキン8 (IL-8)として公知である) ; CXCR4のアゴニスト、例えばCTCE-02142、及びMet-SDF-1など、 ; 最晩期抗原 (VLA)-4阻害剤 ; CXCR4のアンタゴニスト、例えばTG-0054、プレキサフォル (また、AMD3100として公知である)、及びAMD3465、又は前述の薬剤の任意の組み合わせを含む。動員薬剤は末梢血中の幹細胞の数を増加させ、このように、移植、臓器修復もしくは再生、又は疾患の処置における使用のための幹細胞のより利用可能な供給源を可能にする。

10

【0016】

本明細書中で使用される場合、用語「単離細胞」は、それが最初に見出された生物から取り出された細胞、又はそのような細胞の子孫を指す。場合により、真核細胞は、例えば、他の細胞の存在においてインビトロで培養されている。場合により、真核細胞は、後に第2の生物中に導入されるか、又はそれ (もしくはそれが由来する細胞) が単離された生物中に再導入される。本明細書中で使用される場合、本明細書中で使用される細胞の単離集団に関する用語「単離集団」は、細胞の混合集団又は不均一集団から取り出された及び分離された細胞の集団を指す。一部の実施形態では、単離集団は、細胞が単離又は濃縮された不均一集団と比較して、細胞の実質的に純粋な集団である。

20

【0017】

本明細書中で使用される場合、用語「アルファグロビン」又は「グロビン」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒトにおいてHBA1及びHBA2遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。染色体16上に位置付けられるヒトアルファグロビン遺伝子クラスターは、約30kbに及び、7つの遺伝子座 : 5'-ゼータ-シュードゼータ-ミュー-シュードアルファ-1-アルファ-2-アルファ-1-シータ-3'を含む。アルファ-2 (HBA2) 及びアルファ-1 (HBA1) コード配列は同一である。これらの遺伝子は、5'非翻訳領域及びイントロンにわたりわずかに異なるが、しかし、それらは、3'非翻訳領域にわたり有意に異なる。HBA1及びHBA2についてのENSEMBL ID (即ち、Ensembl Genome Browserデータベースからの遺伝子識別子番号) は、それぞれENSG00000206172及びENSG00000188536である。

30

【0018】

本明細書中で使用される場合、用語「ベータグロビン」又は「グロビン」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、アルファグロビン (HBA) とともに、成人においてヘモグロビン (Hb) の最も一般的な形態を構成するグロビタンパク質を指す。正常な成人Hbは、2つのアルファ鎖及び2つのベータ鎖からなるヘテロ四量体である。HBBは、ヒト染色体11上のHBB遺伝子によりコードされる。それは146アミノ酸長で、15,867Daの分子量を有する。

【0019】

本明細書中で使用される場合、用語「ガンマグロビン」又は「グロビン」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒトにおいてHBG1遺伝子及びHBG2遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。HBG1及びHBG2遺伝子は通常、胎児の肝臓、脾臓、及び骨髄において発現される。2つのグロビン鎖は、2つのグロビン鎖と一緒に、胎児ヘモグロビン (HbF) を構成し、それは通常、誕生の翌年に成人ヘモグロビン (HbA) により置換される。HBG1及びHBG2についてのENSEMBL ID (即ち、Ensembl Genome Browserデータベースからの遺伝子識別子番号) は、それぞれENSG00000213934及びENSG00000196565である。

40

【0020】

本明細書中で使用される場合、用語「転写リプレッサー」は、当技術分野におけるその

50

一般的な意味を有し、遺伝子又は遺伝子のセットの遺伝子転写を減少させるタンパク質（転写因子）を指す。大半のリプレッサーは、エンハンサー又はプロモーター近位エレメントに結合するDNA結合タンパク質である。本開示によれば、転写抑制因子はBCL11Aである。

【0021】

本明細書中で使用される場合、用語「BCL11A」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、BAFクロマチンリモデリング複合体サブユニットBCL11A（遺伝子ID：53335）をコードする遺伝子を指す。この用語はまた、EVI9；CTIP1；DILOS；ZNF856；HBFQTL5；BCL11A-L；BCL11A-S；BCL11a-M；又はBCL11A-XLとして公知である。異なるアイソフォームをコードする、この遺伝子の選択的にスプライシングされた5つの転写産物バリエーションが報告されている。このタンパク質は、クロマチンリモデリングを介して遺伝子発現を調節するSWI/SNF複合体と会合する。BCL11Aは、いくつかの造血系統において高度に発現されており、胎児から成体への赤血球生成移行の間でのグロビン発現からグロビン発現への切り替えにおいて役割を果たす（Sankaran VJ et al. “Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A”, Science Science. 2008 Dec 19;322(5909):1839-42）。

10

【0022】

本明細書中で使用される場合、用語「転写アクチベーター」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、遺伝子又は遺伝子のセットの遺伝子転写を増加させるタンパク質を指す。大半のアクチベーターは、エンハンサー又はプロモーター近位エレメントに結合するDNA結合タンパク質である。本開示によれば、アクチベーターATF4。

20

【0023】

本明細書中で使用される場合、用語「ATF4」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、ヒトにおいてATF4遺伝子（遺伝子ID：468）によりコードされるタンパク質である活性化転写因子4（tax応答性エンハンサーエレメントB67）を指す。ATF4は、このように、HTLV-1のLTR中のtax応答性エンハンサーエレメントに結合することができる、広く発現される哺乳動物DNA結合タンパク質として本来同定された転写アクチベーターである。コードされるタンパク質がまた、単離され、cAMP応答エレメント結合タンパク質2（CREB-2）として特徴付けられた。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、転写因子のAP-1ファミリー、cAMP応答エレメント結合タンパク質（CREB）及びCREB様タンパク質を含む、DNA結合タンパク質のファミリーに属する。これらの転写因子は、タンパク質間相互作用において含まれるロイシンジッパー領域を共有しており、DNA結合ドメインとして機能する、塩基性アミノ酸のストレッチのC末端に位置付けられる。同じタンパク質をコードする2つの代替転写物が記載されている。2つの偽遺伝子は、X染色体上のq28で、大きな逆方向重複を含む領域中に位置付けられる。

30

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「転写アクチベーター結合部位」は、DNA上に存在する部位を指し、それにより、本開示による転写アクチベーターが結合する。本発明によれば、本発明の塩基編集酵素は、アクチベーターが、その転写アクチベーター結合部位に結合することができるように真核細胞のゲノム配列を編集する。

40

【0025】

本明細書中で使用される場合、表現「赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55 kb領域」は、図1中に描写され、配列番号1において示されるヌクレオチド酸配列を有する領域を指す。「ATF4結合部位」は、配列番号1中の位置21のヌクレオチドから位置31のヌクレオチドまで及び（即ち、TTGCATCATCC（配列番号45））。

50

【化 1】

配列番号1>赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55kb領域。

ATF4結合部位は太字及び下線で示されている。

GAGCTCACAGCCTCCAAGCA**TTGCATCATCC**TGGTACCAGGAAGGC

【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「発現」は、ポリヌクレオチドがDNAテンプレートから（例えばmRNA又は他のRNA転写物に）転写される過程、及び/又は転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質に翻訳される過程を指す。転写物及びコードされるポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」として言及され得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAから由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。当技術分野において公知の任意の方法を、遺伝子の発現を測定するために使用することができる（例、タンパク質のHPLC分析及びmRNAのRT-qPCR分析）。典型的には、当該方法は、実施例において記載されている。

10

【0027】

本明細書中で使用される場合、表現「胎児ヘモグロビン含量を増加させる」は、胎児ヘモグロビンが、遺伝子編集プラットフォームで処理された真核細胞において、同等の、真核細胞中よりも少なくとも5%高いことを示し、それにおいて、無関係な遺伝子座を標的化する遺伝子編集プラットフォームが存在する、又は、ここで、遺伝子編集プラットフォームは存在しない。一部の実施形態では、真核細胞における胎児ヘモグロビン発現のパーセンテージは、真核細胞よりも、少なくとも10%高い、少なくとも20%高い、少なくとも30%高い、少なくとも40%高い、少なくとも50%高い、少なくとも60%高い、少なくとも70%高い、少なくとも80%高い、少なくとも90%高い、少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも100倍高い、少なくとも1000倍高い、又はそれ以上である。

20

【0028】

本明細書中で使用される場合、表現「BCL11A発現を抑制する」は、BCL11Aの発現が、本発明の遺伝子編集プラットフォームと接触させた真核細胞において、当該遺伝子と接触させなかった同等の真核細胞よりも少なくとも5%低いことを示す。一部の実施形態では、真核細胞におけるBCL11A発現のパーセンテージは、遺伝子編集プラットフォームと接触させなかった真核細胞よりも、少なくとも10%低い、少なくとも20%低い、少なくとも30%低い、少なくとも40%低い、少なくとも50%低い、少なくとも60%低い、少なくとも70%低い、少なくとも80%低い、少なくとも90%低い、少なくとも1倍低い、少なくとも2倍低い、少なくとも5倍低い、少なくとも10倍低い、少なくとも100倍低い、少なくとも1000倍低い、又はそれ以下である。

30

【0029】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書中では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは直鎖状又は分岐状であってもよく、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、及びそれは非アミノ酸により中断されてもよい。この用語はまた、修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、ペグ化、又は任意の他の操作、例えば標識成分との複合体化など。本明細書中で使用される場合、用語「アミノ酸」は、グリシンD又はL光学異性体の両方、アミノ酸類似体及びペプチド模倣物を含む、天然及び/又は非天然又は合成アミノ酸を含む。

40

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」は、DNA分子（例えば、限定されないが、cDNA又はゲノムDNA）を指す。核酸分子は一本鎖又は二本鎖であることができる。

【0031】

50

本明細書中で使用される場合、核酸分子又はポリペプチドに言及する場合の用語「単離された」は、核酸分子又はポリペプチドが、それが自然界において会合する又は一緒に見出される、少なくとも1つの他の成分を実質的に含まないことを意味する。

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「相補性」は、伝統的なワトソクリック塩基対合又は他の非伝統的な種類のいずれかにより別の核酸配列と水素結合を形成する核酸の能力を指す。相補性パーセントは、第2の核酸配列と水素結合（例、ワトソクリック塩基対合）を形成することができる核酸分子中の残基のパーセンテージ（例、10中5、6、7、8、9、10は50%、60%、70%、80%、90%、100%相補的である）を示す。「完全に相補的」は、核酸配列の全ての連続残基が、第2の核酸配列中の同じ数の連続残基と水素結合することを意味する。本明細書中で使用される「実質的に相補的」は、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50又はそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、又は100%である相補性の程度を指し、あるいはストリンジентな条件下でハイブリダイズする2つの核酸を指す。

10

【0033】

本明細書中で使用される場合、ハイブリダイゼーションについての用語「ストリンジентな条件」は、標的配列への相補性を有する核酸が、標的配列と支配的にハイブリダイズし、非標的配列には実質的にハイブリダイズしない条件を指す。ストリンジентな条件は一般的に、配列依存的であり、多くの要因に依存して変動する。一般的に、配列が長いほど、その配列がその標的配列に特異的にハイブリダイズする温度は高くなる。ストリンジентな条件の非限定的な例は、Tijssen(1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y.において詳細に記載されている。

20

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「ハイブリダイゼーション」又は「ハイブリダイズする」は、完全に又は部分的に相補的な核酸鎖が特定のハイブリダイゼーション条件下で一緒になり、2本の構成鎖が水素結合により連結されている二本鎖構造又は領域を形成する過程を指す。水素結合は典型的には、アデニン及びチミン又はウラシル（A及びT又はU）又はシトシン及びグアニン（C及びG）の間で形成するが、他の塩基対が形成し得る（例、Adams et al., The Biochemistry of the Nucleic Acids, 11th ed., 1992）。

30

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「融合ポリペプチド」又は「融合タンパク質」は、2つ又はそれ以上のポリペプチド配列を一緒に連結することにより作製されるタンパク質を意味する。本発明中に包含される融合ポリペプチドは、第1のポリペプチド、例えば、RNA結合ドメインをコードする核酸配列を、第2のポリペプチド、例えば、エフェクタードメインをコードする核酸配列と連結するキメラ遺伝子構築物の翻訳産物を含み、単一のオープンリーディングフレームを形成する。換言すれば、「融合ポリペプチド」又は「融合タンパク質」は、ペプチド結合により又はいくつかのペプチドを介して連結された2つ又はそれ以上のタンパク質の組換えタンパク質である。融合タンパク質はまた、2つのドメイン間にペプチドリンカーを含み得る。

40

【0036】

本明細書中で使用される用語「野生型」は、当業者により理解される当技術分野の用語であり、生物、株、遺伝子の典型的な形態又は特徴を意味する。なぜなら、それは、変異体又はバリエーション形態から区別されて、自然界において生じるためである。

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「から由来する」は、第1の成分（例、第1の分子

50

)、又はその第1の成分からの情報を使用して、異なる第2の成分(例、第1とは異なる第2の分子)を単離、誘導、又は作製する過程を指す。

【0038】

本明細書中で使用される場合、2つの配列間の「同一性パーセント」は、配列により共有される同一位置の数の関数であり(即ち、同一性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100)、ギャップの数、及び各々のギャップの長さを考慮に入れ、それらは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要がある。配列の比較及び2つの配列間の同一性パーセントの決定は、以下に記載するように、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Needleman及びWunschアルゴリズム(Needleman, Saul B. & Wunsch, Christian D.(1970). "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins". Journal of Molecular Biology. 48(3): 443-53.)を使用して決定することができる。2つのヌクレオチド配列又はアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、例えば、アルゴリズム、例えばEMBOSS Needle(ペアワイズアラインメント; www.ebi.ac.ukで利用可能)などを使用して決定され得る。例えば、EMBOSS Needleは、BLOSUM62マトリックス、「ギャップオープンペナルティ」10、「ギャップ伸長ペナルティ」0.5、偽の「エンドギャップペナルティ」、「エンドギャップオープンペナルティ」10、及び「エンドギャップ伸長ペナルティ」0.5と使用され得る。一般的に、「同一性パーセント」は、一致する位置の数を、比較される位置の数で割って、100により乗じた関数である。例えば、10の配列位置の6つが、アラインメント後の2つの比較された配列間で同一である場合、同一性は60%である。同一性%は典型的には、分析が実行されるクエリ配列の全長にわたって決定される。同じ一次アミノ酸配列又は核酸配列を有する2つの分子は、任意の化学的及び/又は生物学的修飾に関係なく同一である。本発明によれば、第2のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有する第1のアミノ酸配列は、第1の配列が、第2のアミノ酸配列と90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99又は100%の同一性を有することを意味する。

【0039】

本明細書中で使用される場合、用語「リンカー」は、2つ又はそれ以上の実体を連結するために使用される任意の手段、実体、又は部分を指す。リンカーは、共有結合的リンカー又は非共有結合的リンカーであることができる。共有結合的リンカーの例は、共有結合的な結合、あるいは連結されるタンパク質又はドメインの1つ又は複数に共有結合的に付着されたリンカー部分を含む。リンカーはまた、非共有結合的な結合、例えば、金属中心、例えば白金原子などを通じた有機金属結合であることができる。共有結合的な連結については、官能基を使用することができ、例えばアミド基など、炭酸誘導体、エーテル、エステルを含み、有機及び無機エステル、アミノ、ウレタン、尿素及び同様のものを含む。連結を提供するために、ドメインを、酸化、水酸化、置換、還元などにより修飾して、カップリングのための部位を提供することができる。複合体化のための方法は、当業者に周知であり、本発明における使用のために包含される。リンカー部分は、限定されないが、化学リンカー部分、又は例えば、ペプチドリンカー部分(リンカー配列)を含む。RNA結合ドメイン及びエフェクタードメインの機能を有意に減少させない修飾が好まれることが理解されるであろう。

【0040】

本明細書中で使用される場合、「連結された」は、1つの実体を形成するための、2つ又はそれ以上の実体を指す。複合体は、ペプチド-小分子複合体ならびにペプチド-タンパク質/ペプチド複合体の両方を包含する。

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「塩基編集酵素」は、デアミナーゼポリペプチドに連結された欠損CRISPR/Casヌクレアーゼを含む融合タンパク質を指す。この用語はまた、「塩基エディター」として公知である。2つのクラスの塩基編集酵素-シトシ

ン塩基編集酵素（CBE）及びアデニン塩基編集酵素（ABE）-を使用して、二本鎖切断を伴わない単一塩基対編集を生成することができる。典型的には、シトシン塩基編集酵素は、欠損したCRISPR/Casヌクレアーゼをデアミナーゼに融合させることにより作製される。

【0042】

本明細書中で使用される場合、用語「デアミナーゼ」は、脱アミノ化反応を触媒する酵素を指す。用語「脱アミノ化」は、本明細書中で使用されるように、1つの分子からのアミン基の除去を指す。一部の実施形態では、デアミナーゼはシチジン・デアミナーゼであって、それぞれウラシル又はデオキシウラシルへのシチジン又はデオキシシチジンの加水分解的な脱アミノ化を触媒する。一部の実施形態では、デアミナーゼはアデノシン・デアミナーゼであって、イノシンへのアデノシンの加水分解的な脱アミノ化を触媒し、それは細胞によりグアノシンのように処理され、AからG（又はTからC）への変化を作製する。

10

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「ヌクレアーゼ」は、核酸配列中の切断、例えば、二本鎖DNA配列中の一本又は二本鎖切断を誘導するタンパク質（即ち、酵素）を含む。

【0044】

本明細書中で使用される場合、用語「CRISPR/Casヌクレアーゼ」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、クラスター化された規則的に間隔をあけられた短いパリンドロームリピート（CRISPR）及びCas遺伝子によりコードされる関連ヌクレアーゼを含む原核生物DNAのセグメントを指す。細菌では、CRISPR/Cas遺伝子座は、移動性遺伝子要素（ウイルス、転移要素、及び接合プラスミド）に対するRNA誘導適応免疫システムをコードする。3種類のCRISPRシステムが同定されている。CRISPRクラスターは、先行する可動要素に相補的な配列であるスペーサーを含む。CRISPRクラスターは転写され、成熟CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic repeats）RNA（crRNA）にプロセシングされる。CRISPR/CasヌクレアーゼCas9及びCpf1は、II型及びV型CRISPR/Casシステムに属し、標的DNAを切断する強力なエンドヌクレアーゼ活性を有する。Cas9は、約20ヌクレオチドの固有の標的配列（スペーサーと呼ばれる）、及びプレcrRNAのリボヌクレアーゼIII支援プロセシングのガイドとしての役割も果たすトランス活性化低分子RNA（tracrRNA）を含む成熟crRNAによりガイドされる。crRNA：tracrRNA二重鎖は、crRNA上のスペーサーと標的DNA上の相補配列（プロトスペーサーと呼ばれる）の間での相補的塩基対合を介して、Cas9を標的DNAに向ける。Cas9はトリヌクレオチド（S.ピオゲネスCas9についてはNGG）プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）を認識して、切断部位（PAMから上流の3番目又は4番目のヌクレオチド）を特定する。

20

30

【0045】

本明細書中で使用される場合、用語「Cas9」又は「Cas9ヌクレアーゼ」は、Cas9タンパク質、又はその断片（例、Cas9の活性もしくは不活性DNA切断ドメインを含むタンパク質、及び/又はCas9のgRNA結合ドメイン）を含むRNA誘導性ヌクレアーゼを指す。Cas9ヌクレアーゼはまた、casn1ヌクレアーゼ又はCRISPR（クラスター化された規則的に間隔をあけられた短いパリンドロームリピート）関連ヌクレアーゼとして時折言及される。CRISPRは、移動性遺伝子要素（ウイルス、転移要素、及び接合プラスミド）に対する防御を提供する適応免疫システムである。CRISPRクラスターは、スペーサー、先行する可動要素に相補的な配列、及び標的侵入核酸を含む。CRISPRクラスターは転写され、CRISPR RNA（crRNA）にプロセシングされる。II型CRISPRシステムでは、プレcrRNAの正確なプロセシングは、トランスエンコードされた低分子RNA（tracrRNA）、内因性リボヌクレアーゼ3（rnc）、及びCas9タンパク質を要求する。

40

50

t r a c r R N A は、プ レ c r R N A のリボヌクレアーゼ 3 支援プロセッシングのためのガイドとしての役割を果たす。その後、C a s 9 / c r R N A / t r a c r R N A は、スペーサーに相補的な線状又は環状 d s D N A 標的をエンドヌクレアーゼ的に切断する。c r R N A に相補的ではない標的鎖は、最初にエンドヌクレオチド分解的に切断され、次に 3' - 5' エキソヌクレオチド分解的にトリミングされる。自然界では、D N A 結合及び切断は、典型的には、タンパク質及び両方の R N A を要求する。しかし、シングルガイド R N A (「s g R N A」、又は単に「g N R A」) は、c r R N A 及び t r a c r R N A の両方の側面を単一の R N A 種に組み入れるように操作することができる。例えば、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照のこと。その内容全体が、本明細書により、参照により本明細書中に組み入れられる。C a s 9 は、C R I S P R リピート配列中の短いモチーフ (P A M 又はプロトスペーサー隣接モチーフ) を認識し、自己対非自己を区別するのに役立つ。C a s 9 ヌクレアーゼ配列及び構造は当業者に周知である (例、“Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes.” Ferretti et al., J. J., McShan W. M., Ajdic D. J., Savic D. J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A. N., Kenton S., Lai H. S., Lin S. P., Qian Y., Jia H. G., Najjar F. Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S. W., Roe B. A., McLaughlin R. E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001); “CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.” Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011); 及び “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.” Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照のこと。それらの各々の内容全体が、参照により本明細書中に組み入れられる)。C a s 9 オルソログは、限定されないが、S . ピオゲネス及び S . サーマフィラスを含む、種々の種において記載されている。追加の適切な C a s 9 ヌクレアーゼ及び配列は、本開示に基づいて当業者には明らかであり、そのような C a s 9 ヌクレアーゼ及び配列は、Chylinski, Rhun, and Charpentier, “The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems” (2013) RNA Biology 10: 5, 726-737において開示される生物及び遺伝子座からの C a s 9 配列を含む; その内容全体が、参照により本明細書中に組み入れられる。一部の実施形態では、用語「C a s 9」は、以下からの C a s 9 を指す: コリネバクテリウム・ウルセランス (N C B I 参照: N C _ 0 1 5 6 8 3 . 1、N C _ 0 1 7 3 1 7 . 1); コリネバクテリウム・ジフテリア (N C B I 参照: N C _ 0 1 6 7 8 2 . 1、N C _ 0 1 6 7 8 6 . 1); スピロプラズマ・シルフィジコラ (N C B I 参照: N C _ 0 2 1 2 8 4 . 1); プレボテラ・インターメディア (N C B I 参照: N C _ 0 1 7 8 6 1 . 1); スピロプラズマ・タイワネンセ (N C B I 参照: N C _ 0 2 1 8 4 6 . 1); ストレプトコッカス・イニアエ (N C B I 参照: N C _ 0 2 1 3 1 4 . 1); ベリエラ・バルティカ (N C B I 参照: N C _ 0 1 8 0 1 0 . 1); サイクロフレクス・トーキス I (P s y c h r o f l e x u s t o r q u i s) I (N C B I 参照: N C _ 0 1 8 7 2 1 . 1); ストレプトコッカス・サーモフィルス (N C B I 参照: Y P _ 8 2 0 8 3 2 . 1); リステリア・イノクア (N C B I 参照: N P _ 4 7 2 0 7 3 . 1); カンピロバクター・ジェジュニ (N C B I 参照: Y P _ 0 0 2 3 4 4 9 0 0 . 1); 又はナイセリア・メニンギティディス (N C B I 参照: Y P _ 0 0 2 3 4 2 1 0 0 . 1)。典型的には、C a s 9 ヌクレアーゼは、配列番号 2 において示されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【化 2】

配列番号2: Cas9配列

```

MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPKSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEI FSNEMAKVDDSFHHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDL
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRRQOLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYVYVGLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVV
KGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL
FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL
TTLTFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDFG
RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKGGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF
DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD
RKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEI GKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG
FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFDSPTVAYSVLVAKVEKGGKSKLKS VKELLGITIMERS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFY LASHY
EKLKGS PEDNEQQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPI REQAENI IH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

```

10

20

【0046】

本明細書中で使用される場合、用語「欠損CRISPR/Casヌクレアーゼ」は、少なくとも1つのヌクレアーゼドメインを失ったCRISPR/Casヌクレアーゼを指す。

【0047】

本明細書中で使用される場合、用語「ニッカーゼ」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、DNA二本鎖の一本鎖だけを切断するエンドヌクレアーゼを指す。したがって、用語「Cas9ニッカーゼ」は、典型的にはCas9タンパク質の1つのヌクレアーゼドメインを不活性化することにより、Cas9タンパク質から由来するニッカーゼを指す。

30

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「ガイドRNA分子」は、一般的に、Cas9タンパク質に結合し、Cas9タンパク質を標的DNA内の特定の位置に標的化することができるRNA分子（又は集合的にRNA分子の群）を指す。ガイドRNAは、2つのセグメント：DNA標的化ガイドセグメント及びタンパク質結合セグメントを含むことができる。DNA標的化セグメントは、標的配列に相補的である（又は少なくともストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる）ヌクレオチド配列を含む。タンパク質結合セグメントは、CRISPRタンパク質、例えばCas9又はCas9関連ポリペプチドなどと相互作用する。これら2つのセグメントは、同じRNA分子中に、あるいは2つ又はそれ以上の別々のRNA分子中に位置付けることができる。2つのセグメントが別々のRNA分子中にある場合、DNA標的化ガイドセグメントを含む分子は時折、CRISPR RNA (crRNA) として言及される一方で、タンパク質結合セグメントを含む分子は、トランス活性化RNAとして言及される (tracrRNA)。

40

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「標的核酸」又は「標的」は、標的核酸配列を含む核酸を指す。標的核酸は一本鎖又は二本鎖であり得るが、しばしば、二本鎖DNAである。「標的核酸配列」、「標的配列」又は「標的領域」は、本明細書中で使用される場合、本明細書中で開示されるCRISPRシステムを使用して結合することを望む特定の配列又はその相補体を意味する。

【0050】

50

本明細書中で使用される場合、用語「標的核酸鎖」は、本明細書中に開示されるガイドRNAとの塩基対合に供される標的核酸の鎖を指す。すなわち、crRNA及びガイド配列とハイブリダイズする標的核酸の鎖は、「標的核酸鎖」として言及される。標的核酸の他の鎖は、ガイド配列に相補的ではなく、「非相補的鎖」として言及される。二本鎖標的核酸（例、DNA）の場合では、各々の鎖は、crRNA及びガイドRNAを設計するための「標的核酸鎖」となり、適切なPAM部位がある限り、本発明の方法を実行するために使用することができる。

【0051】

本明細書中で使用される場合、用語「リボ核タンパク質複合体」又は「リボ核タンパク質粒子」は、核タンパク質及びリボ核酸を含む複合体又は粒子を指す。本明細書中で提供される「核タンパク質」は、核酸（例、RNA、DNA）に結合することが可能なタンパク質を指す。核タンパク質がリボ核酸に結合する場合、それは「リボ核タンパク質」として言及される。リボ核タンパク質とリボ核酸の間での相互作用は、例えば、共有結合的な結合により直接的、又は非共有結合的な結合（例、静電相互作用（例、イオン結合、水素結合、ハロゲン結合）、ファンデルワールス相互作用（例、双極子-双極子、双極子誘導性双極子、ロンドン分散）、環スタッキング（パイ効果）、疎水性相互作用及び同様のもの）により間接的であり得る。

10

【0052】

本明細書中で使用される場合、用語「変異」は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、置換、欠失、又は挿入を指す。用語「置換」は、特定の位置での特定のアミノ酸残基が除去され、別のアミノ酸残基が同じ位置に挿入されることを意味する。用語「欠失」は、特定のアミノ酸残基が除去されることを意味する。用語「挿入」は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、特定のアミノ酸残基の前後に挿入されることを意味する。

20

【0053】

本明細書中で使用される場合、用語「変異誘発」は、ポリヌクレオチド配列中への変異の導入を指す。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「バリエント」は、第2の組成物（例、「親」分子とも呼ばれる第2の分子）に関連する第1の組成物（例、第1の分子）を指す。バリエント分子は、親分子から由来する、それから単離される、それに基づく、又はそれと相同であることができる。バリエント分子は、元の親分子と完全な配列同一性を有することができる、又は代替的に、親分子と100%未満の配列同一性を有することができる。例えば、配列のバリエントは、元の配列と比較して、配列において、少なくとも50；51；52；53；54；55；56；57；58；59；60；61；62；63；64；65；66；67；68；69；70；71；72；73；74；75；76；77；78；79；80；81；82；83；84；85；86；87；88；89；90；91；92；93；94；95；96；97；98；99；100%同一である第2の配列であることができる。

30

【0055】

本明細書中で使用される場合、用語「処置」又は「処置する」は、疾患に罹患するリスクがある患者、又は疾患に罹患している疑いのある患者、ならびに病気である、又は疾患もしくは医学的状态に苦しんでいるとして診断された患者の処置を含む、予防的又は防止的処置ならびに治癒的又は疾患修飾処置の両方を指し、臨床的再発の抑制を含む。処置は、障害又は再発性障害を防止する、治癒させる、その発症を遅延させる、重症度を低下させる、又はその1つもしくは複数の症状を寛解させるために、あるいは、そのような処置の非存在において予想されるものを超えて対象の生存を延長するために、医学的障害を有する、又は最終的に障害を獲得し得る対象に投与されてもよい。「治療レジメン」により、病気の処置のパターン、例えば、治療の間に使用される投薬のパターンを意味する。治療レジメンは、導入レジメン及び維持レジメンを含み得る。語句「導入レジメン」又は「導入期間」は、疾患の初期処置のために使用される治療レジメン（又は治療レジメンの一

40

50

部)を指す。導入レジメンの一般的な目標は、処置レジメンの初期期間の間に患者に高レベルの薬物を提供することである。導入レジメンは、(部分的に又は全体的に)「負荷レジメン」を用いてもよく、それは、医師が維持レジメンの間に用い得るよりも多くの用量の薬物を投与すること、医師が維持レジメンの間に薬物を投与するよりも頻りに薬物を投与すること、又はその両方を含み得る。語句「維持レジメン」又は「維持期間」は、病気の処置の間での患者の維持のために、例えば、患者を長期間(月又は年)にわたり寛解に保つために使用される治療レジメン(又は治療レジメンの一部)を指す。維持レジメンは、連続治療(例、定期的な間隔で、例えば、毎週、毎月、毎年などで薬物を投与する)又は断続的治療(例、中断された処置、断続的処置、再発時での処置、又は特定の事前に決定された基準[例、疼痛、疾患発現など]の達成時での処置)を用い得る。

10

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「治療有効量」は、任意の医学的処置に適用可能な妥当な利益/リスク比率で疾患を処置するのに十分な量の細胞集団を意味する。本発明の全使用組成は、健全な医学的判断の範囲内で主治医により決定されることが理解されるであろう。任意の特定の患者についての具体的な治療有効用量レベルは、多様な因子に依存し、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別及び食事、投与の時間、投与の経路、処置の期間、細胞の集団との組み合わせにおいて又は同時に使用される薬物、及び医療分野において周知の同様の因子を含む。一部の実施形態では、細胞は、最初にそれらの培養培地から細胞を回収し、次に、細胞を洗浄し、投与のために適切な培地及び容器系(「医薬的に許容可能な」担体)中で、処置有効量中で濃縮することにより製剤化される。適切な注入媒体は、任意の等張媒体製剤、典型的には、生理食塩水、Normosol R (Abbott) 又はPlasma-Lyte A (Baxter)であり得るが、しかし、また、水中5%ブドウ糖又は乳酸リンガーを利用することができる。注入媒体は、ヒト血清アルブミンを用いて補充することができる。組成物中の細胞の処置有効量は、所望の特異性を伴う細胞の相対的な提示に、レシピエントの年齢及び体重に、ならびに標的状態の重症度に依存的である。この細胞の数は、約 10^3 個/kg、好ましくは 5×10^3 個/kgと低くてもよく;及び 10^7 個/kg、好ましくは 10^8 個/kgと高くてもよい。細胞の数は、そこで含まれる細胞の種類と同様に、組成物が意図される最終的な使用に依存する。典型的には、最小用量は1kg当たり200万個の細胞である。通常、200万から2000万個の細胞が、対象において注射される。所望の純度を、選別工程を導入することにより達成することができる。本明細書中で提供される使用については、細胞は、一般的に、1リットル又はそれ以下の体積中であり、500ml又はそれ以下、さらには250mlあるいは100ml又はそれ以下であり得る。臨床的に関連する細胞の数は、累積的に、所望の細胞の総量と等しい又はそれを超える複数回注入に分配することができる。

20

30

【0057】

方法:

したがって、本発明の第1の目的は、真核細胞における胎児ヘモグロビン含量を増加させるための方法であって、真核細胞を、(a)少なくとも1つの塩基編集酵素及び(b)塩基編集酵素を、赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55kb領域中の少なくとも1つの標的配列にガイドするための少なくとも1つのガイドRNA分子からなる遺伝子編集プラットフォームと接触させ、それにより、BCL11Aの発現を抑制し、その後ヘモグロビンの発現を増加させるために、当該領域中のATF4結合部位を編集及び破壊する工程を含む。

40

【0058】

一部の実施形態では、真核細胞は、造血前駆細胞、造血幹細胞(HSC)、多能性細胞(即ち、胚性幹細胞(ES)及び人工多能性幹細胞(iPS))からなる群より選択される。典型的には、真核細胞は幹細胞動員からもたらされる。

【0059】

一部の実施形態では、本発明の塩基編集酵素は、欠損CRISPR/Casヌクレアーゼを含む。配列認識機構は、非欠損CRISPR/Casヌクレアーゼについてと同じで

50

ある。典型的には、本発明の欠損CRISPR/Casヌクレアーゼは、少なくとも1つのRNA結合ドメインを含む。RNA結合ドメインは、本明細書中で後に定義するガイドRNA分子と相互作用する。しかし、本発明の欠損CRISPR/Casヌクレアーゼは、ヌクレアーゼ活性を伴わない改変バージョンである。したがって、欠損CRISPR/Casヌクレアーゼは、ガイドRNA分子を特異的に認識し、このように、塩基編集酵素をその標的DNA配列にガイドする。

【0060】

一部の実施形態では、欠損CRISPR/Casヌクレアーゼを改変して、核酸結合親和性及び/又は特異性を増加させ、酵素活性を変えて、及び/又はタンパク質の別の特性を変化させることができる。一部の実施形態では、タンパク質のヌクレアーゼドメインを改変、欠失、又は不活化することができる。一部の実施形態では、タンパク質を切断して、タンパク質の機能のために必須ではないドメインを除去することができる。一部の実施形態では、タンパク質を切断又は改変して、RNA結合ドメインの活性を最適化する。

10

【0061】

一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、変異体CRISPR/Casヌクレアーゼ、即ち、1つ又は複数の点変異、挿入、欠失、切断を有するタンパク質、融合タンパク質、又はそれらの組み合わせからなる。一部の実施形態では、変異体はRNAガイドDNA結合活性を有するが、しかし、そのヌクレアーゼ活性部位の一方又は両方を欠く。一部の実施形態では、変異体は、CRISPR/Casヌクレアーゼの野生型アミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。種々のCRISPR/Casヌクレアーゼを本発明において使用することができる。適切なCRISPR/Casヌクレアーゼの非限定的な例は、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e(又はCasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1(又はCasA)、Cse2(又はCasB)、Cse3(又はCasE)、Cse4(又はCasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csz1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、及びCu1966を含む。例えば、WO2014144761 WO2014144592、WO2013176772、US20140273226、及びUS20140273233を参照のこと。それらの内容は、それらの全体において参照により本明細書中に組み入れられる。

20

30

【0062】

一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、II型CRISPR-Cas系から由来する。一部の実施形態では、CRISPR/CasヌクレアーゼはCas9タンパク質から由来する。Cas9タンパク質は、とりわけ、ストレプトコッカス・ピオゲネス、ストレプトコッカス・サーモフィルス、ストレプトコッカス属、ノカルジオブシス・ダッソンブレイ、ストレプトマイセス・プリスチナエスピラリス、ストレプトマイセス・ピリドクロモゲネス、ストレプトマイセス・ピリドクロモゲネス、ストレプトスポランジウム・ロゼウム、ストレプトスポランジウム・ロゼウム、アリサイクロバチルス・アシドカルダリウス、バチルス・シュードミコイデス、バチルス・セレニティレデュセンズ、エクシグオバクテリウム・シビリカム、ラクトバチルス・デルブリッキ、ラクトバチルス・サリバリウス、マイクロシラ・マリナ、パークホルデアレス細菌、ポラロモナス・ナフタレニボランス、ポラロモナス属、クロコスファエラ・ワトソニー、シアノセイス属、マイクロシスチス・アエルギノーサ、シネココッカス属、アセトハロピウム・アラバチカム、アンモニフェックス・デゲンシイ、カルジセルロシラプター・ベクシイ(Caldicellulosiruptor bescsii)、カンジダトウス・デスルフォルディス、クロストリジウム・ボツリヌス、クロストリジウム・ジフィシル、フィネゴルディ

40

50

ア・マグナ、ナトラナエロピウス・サーモフィルス、ペロトマクラム・サーモプロピオニカム、アシディチオパチルス・カルダス、アシディチオパチルス・フェロオキシダンス、アロクロマチウム・ヴィノスム、マリノバクター属、ニトロソコッカス・ハロフィルス、ニトロソコッカス・ワトソーニ、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス、クテドノバクター・ラセミファー、メタノハロピウム・エベスチガタム、アナベナ・バリアピリス、ノジュラリア・スプミゲナ、ノストック属、アルスロスピラ・マキシマ、アルスロスピラ・プラテンシス、アルトロスピラ属、リングピア属、マイクロコレウス・クトノプラステス、オスキラトリア属、ペトロトガ・モビリス、サーモシフォ・アフリカヌス、又はアカリオクロリス・マリナからであり得る。

【0063】

10

一部の実施形態では、CRISPR/Casヌクレアーゼは、野生型CRISPR/Casヌクレアーゼ（例えばCas9など）の変異体又はその断片である。一部の実施形態では、CRISPR/CasヌクレアーゼはS・ピオゲネスからの変異体Cas9タンパク質である。

【0064】

不活性なDNA切断ドメインを有するCas9タンパク質（又はその断片）を生成するための方法が、公知である（例、Jinek et al., Science. 337:816-821(2012); Qi et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression" (2013) Cell. 28; 152(5):1173-83を参照のこと。それらの各々の内容全体が、参照により本明細書中に組み入れられる）。例えば、Cas9のDNA切断ドメインは、2つのサブドメイン、HNHヌクレアーゼサブドメイン及びRuvC1サブドメインを含むことが公知である。HNHサブドメインはgRNAに相補的な鎖を切断するのに対し、RuvC1サブドメインは非相補鎖を切断する。これらのサブドメイン内の変異によって、Cas9のヌクレアーゼ活性を抑制することができる。例えば、変異D10A及びH841Aは、S・ピオゲネスCas9のヌクレアーゼ活性を完全に不活性化する（Jinek et al., Science. 337:816-821(2012); Qi et al., Cell. 28; 152(5):1173-83(2013)。

20

【0065】

一部の実施形態では、本発明のCRISPR/Casヌクレアーゼはニッカーゼ、より具体的にはCas9ニッカーゼ、即ち、D10A及びH840Aからなる群より選択される1つの変異を有する、S・ピオゲネスからのCas9である。一部の実施形態では、本発明のニッカーゼは、配列番号3又は配列番号4において示されるアミノ酸配列を含む。

30

40

50

【化 3】

配列番号3>D10A変異を有するS. ピオゲネスnCas9タンパク質配列

```

MDKKYSIGLAIAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIIFGNIVDEVAYHEKYPTIIYHL
RKKLVDSTDKADLRIYLALAHMIIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIILLSIDLRVNTEITKAPLSASMIIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIIKPILEKMDGTEELLVIKLNRDILLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYIPFLKDNREKIEKILTFRIIPYYVGPLARGNSRFIAWMTRKSEETITPWNFEIEVVD
KGASQSFIERMTNFDKINLPNEKVLIPKHSLLYEYFTVYNELTKVIKYVTEGMRKPAFLSIGEQKKAIVDILL
FKTNRKVTIVKQLKEDYFKKIECFDSVEISIGVEDRFNASLGTIYHDLILKIIKDKDFLDNEENEDIILEDIVL
TLTLFEDREMIIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTIGWGRLSRKLINGIIRDKQSGKTIILDIFLKSDGFAN
RNFIMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELIVKVMGRHKPENI
VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRIIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDIVHIVPQSFLKDDSIDNKVILTRSDKNRGSIDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF
DNLTKAERGGLSELDKAGFIKIRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIIREVKVITLISKLVSDIF
RKDFQFYKIVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKIVYDVRKMIIAKSEQEIIGKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIIRKRPLIIETNGETGEIIVWDKGRDFATVRKIVLSMPQVNIIVKKTEVQTGG
FSKESILPKRNSDKLIARIKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSIVLVAKVEKIGKSKKLKSVKELLGITIMERSIS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIIKLPKYSILFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFIFLYILASHY
EKILKGSPEIDNEQQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKIRVIILADANLDKIVLSAYNKHRDKPIIREQAENIIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQISITGLYETRIDLSQLGGD

```

10

20

【化 4】

配列番号4>H840A変異を有するS. ピオゲネスnCas9タンパク質配列

```

MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIIFGNIVDEVAYHEKYPTIIYHL
RKKLVDSTDKADLRIYLALAHMIIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVD
AKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDLD
NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIILLSIDLRVNTEITKAPLSASMIIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE
KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIIKPILEKMDGTEELLVIKLNRDILLRKQRTFDNGSIPHQI
HLGELHAILRRQEDFYIPFLKDNREKIEKILTFRIIPYYVGPLARGNSRFIAWMTRKSEETITPWNFEIEVVD
KGASQSFIERMTNFDKINLPNEKVLIPKHSLLYEYFTVYNELTKVIKYVTEGMRKPAFLSIGEQKKAIVDILL
FKTNRKVTIVKQLKEDYFKKIECFDSVEISIGVEDRFNASLGTIYHDLILKIIKDKDFLDNEENEDIILEDIVL
TLTLFEDREMIIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTIGWGRLSRKLINGIIRDKQSGKTIILDIFLKSDGFAN
RNFIMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELIVKVMGRHKPENI
VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRIIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL
DINRLSDYDIVDAIIVPQSFLKDDSIDNKVILTRSDKNRGSIDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF
DNLTKAERGGLSELDKAGFIKIRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIIREVKVITLISKLVSDIF
RKDFQFYKIVREINNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKIVYDVRKMIIAKSEQEIIGKATAK
YFFYSNIMNFFKTEITLANGEIIRKRPLIIETNGETGEIIVWDKGRDFATVRKIVLSMPQVNIIVKKTEVQTGG
FSKESILPKRNSDKLIARIKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSIVLVAKVEKIGKSKKLKSVKELLGITIMERSIS
FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIIKLPKYSILFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFIFLYILASHY
EKILKGSPEIDNEQQLFVEQHKHYLDEIIIEQISEFSKIRVIILADANLDKIVLSAYNKHRDKPIIREQAENIIIH
LFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQISITGLYETRIDLSQLGGD

```

30

40

【0066】

一部の実施形態では、D10A又はH840A以外の変異を有するCas9バリエーションが使用され、それによって、例えば、ヌクレアーゼ不活化Cas9(dCas9)がもたらされる。そのような変異は、一例として、D10及びH840での他のアミノ酸置換、又はCas9のヌクレアーゼドメイン内の他の置換(例、HNHヌクレアーゼサブドメイン及び/又はRuvC1サブドメイン中の置換)を含む。一部の実施形態では、dCas9のバリエーションが提供され、それは、配列番号2又は3と少なくとも約70%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、又は少なくとも約99%同一、少なくとも約99.5%同一、又は少なくとも約99.9%同一である。一部の実施形態では、dCas9のバリエーションが提供され、

50

約 5 アミノ酸だけ、約 10 アミノ酸だけ、約 15 アミノ酸だけ、約 20 アミノ酸だけ、約 25 アミノ酸だけ、約 30 アミノ酸だけ、約 40 アミノ酸だけ、約 50 アミノ酸だけ、約 75 アミノ酸だけ、約 100 アミノ酸又はそれ以上だけ配列番号 2 又は 3 よりも短い、あるいは長いアミノ酸配列を有する。

【0067】

本発明によれば、本明細書中に開示される塩基編集酵素の第 2 の成分は、デアミナーゼである非ヌクレアーゼ DNA 修飾酵素を含む。

【0068】

一部の実施形態では、デアミナーゼはシチジンデアミナーゼである。一部の実施形態では、デアミナーゼは、アポリポタンパク質 B mRNA 編集複合体 (APOBEC) ファミリーデアミナーゼである。一部の実施形態では、デアミナーゼは APOBEC1 ファミリーデアミナーゼである。一部の実施形態では、デアミナーゼは活性化誘導性シチジンデアミナーゼ (AID) である。一部の実施形態では、デアミナーゼは ACF1 / ASE デアミナーゼである。

10

【0069】

一部の実施形態では、デアミナーゼは、AID：活性化誘導性シチジン・デアミナーゼ、APOBEC1：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 1、APOBEC3A：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3A、APOBEC3B：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3B、APOBEC3C：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3C、APOBEC3D：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3D、APOBEC3F：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3F、APOBEC3G：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3G、APOBEC3H：アポリポタンパク質 B mRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 3H、ADA：アデノシン・デアミナーゼ、ADAR1：RNA₁ に作用するアデノシン・デアミナーゼ、Dnmt1：DNA (シトシン - 5 -) - メチルトランスフェラーゼ 1、Dnmt3a：DNA (シトシン - 5 -) - メチルトランスフェラーゼ 3 アルファ、Dnmt3b：DNA (シトシン - 5 -) - メチルトランスフェラーゼ 3 ベータ及び Tet1：メチルシトシン・ジオキシゲナーゼからなる群より選択される。

20

【0070】

一部の実施形態では、デアミナーゼは、活性化誘導性シチジンデアミナーゼ (AID) から由来する。AID は、DNA 又は RNA の状況においてシトシンの脱アミノ化の反応を触媒することができるシチジンデアミナーゼである。標的部位に運ばれた場合、AID は C 塩基を U 塩基に変化させる。分裂している細胞では、これは、C から T 点変異に導き得る。あるいは、U への C の変化は、細胞 DNA 修復経路、主に切除修復経路を誘発し、それによって、ミスマッチ U - G 塩基対が除去され、T - A、A - T、C - G、又は G - C 対で置換される。その結果、点変異が標的 C - G 部位で生成され得る。一部の実施形態では、DNA 修飾酵素は、核輸出シグナル (NES) が除去された、増加した SHM 活性を伴う AID 変異体である AID* である (Hess GT, Fresard L, Han K, Lee CH, Li A, Cimprich KA, Montgomery SB, Bassik MC: Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. Nat Methods 2016, 13(12):1036-1042)。

30

40

【0071】

一部の実施形態では、デアミナーゼは、配列番号 5 ~ 15 において示されるアミノ酸配列のバリエーションからなる。

50

【化 5】

配列番号5トAID:

MDSLMLNRRKFLYQFKNVRWAKGRRETYLCYVVKRRDSATSFSLDFGYLRNKNKGCHVELLFLRYISDWD
LDPGRCYRVTWFTSWSPCYDCARHVADFLRGNPNLSLRIFTARLYFCEDRKAEEGLRRLHRAGVQIAI
MTFKDYFYCWNT FVENHERTFKAWEGLEHNSVRLSRQLRRI LLLPLYEVDDLRLDAFRTLGL

【化 6】

配列番号6トAPOBEC-3G

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSELKYHPEMR
FFHWFSKWRKLHRDQEYEVWYI SWSPCTKCTRDMATFLAEDPKVTLTI FVARLYYFWDPDYQEALRSL
CQKRDGPRATMKIMNYDEFQHCWSKFVYSQRELFEPWNNLPKYIILLHIMLGEILRHSMDPPTFTFNFN
NEPWVRGRHETLYLCYEVERMHNDTWVLLNQRRGFLCNQAPHKHGFLEGRHAELCFLDVI PFWKLDLDQD
YRVTCFTSWSPCFSCAQEMAKFISKNKHVSLCIFTARIYDDQGRCEGLRTLAEAGAKISIMTYSEFKH
CWDTFVDHQGCPFQPWDGLDEHSQDLSGRLRAILQNQEN

10

【化 7】

配列番号7トAPOBEC-3F

MKPHFRNTVERMYRDTFSYNFYNRPILSRRNTVWLCYEVKTKGPSRPPLDAKIFRGQVYSQPEHHAEMC
FLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDCVAKLAEFLAHPNVTTLTI SAARLYYYWERDYRRALCRLS
QAGARVKIMDDEEFAYCWENFVYSEGQPFMPWYKFDNYAFLHRTLKEILRNPMYPHI FYFHFKNL
RKAYGRNESWLCFTMEVVKHHSVSWKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTS
WSPCECAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFWDTDYQEGRLSLSQEGASVEIMGYKDFKYCWENFVY
NDDEPFKPKWGLKYNFLFLDSKLQEIIE

20

【化 8】

配列番号8トAPOBEC-3B:

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLWCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFRGQVYFKPQYHAEM
CFLSWFCGNQLPAYKCFQITWFVSWTPCPDCVAKLAEFLSEHPNVTTLTI SAARLYYYWERDYRRALCRL
SQAGARVTIMDYEEFAYCWENFVYNEGQQFMPWYKFDENYAFHRTLKEILRYLMDPDTFTFNFNNDPL
VLRRTQTYLCYEVERLDNGTWVLMQHMGLFCNEAKNLLCGFYGRHAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVT
WFI SWSPCFSWGCGAGEVRAFLQENTHVRLRI FAARIYDYDPLYKEALQMLRDAGAQVSIMTYDEFEYCW
DTFVYRQGCPFQPWDGLEEHSQALSGLRLRAILQNQGN

30

【化 9】

配列番号9トAPOBEC-3C:

MNPQIRNPMKAMYPGTFYFQFKNLWEANDRNWLCFTVEGIKRRSVVSWKTGVFRNQVDSETHCHAER
CFLSWFCDDILSPNTKYQVTWYTSWSPCPDCAGEVAEFLARHSNVNLTIFTARLYYFQYPCYQEGRLSL
SQEGVAVEIMDYEDFKYCWENFVYNDNEPFKPKWGLKTNFRLLKRRRLRESLQ

【化 10】

配列番号10トAPOBEC-3A:

MEASPASGPRHLMDPHIFTSNFNNGIGRHKTYLCYEVERLDNGTSVKMDQHRGFLHNQAKNLLCGFYGR
HAELRFLDLVPSLQLDPAQIYRVTWFI SWSPCFSWGCGAGEVRAFLQENTHVRLRI FAARIYDYDPLYKE
ALQMLRDAGAQVSIMTYDEFKHCWDTFVDHQGCPFQPWDGLEEHSQALSGLRLRAILQNQGN

40

50

【化 1 1】

配列番号11トAPOBEC-3H:

MALLTAETFRLQFNNKRRRLRRPYYPKALLCYQLTPQNGSTPTRGYFENKKKCHAEICFINEIKSMGLD
ETQCYQVTCYLTWSPCSSCAWELVDFIKAHHDHLNLGIFASRLYYHWCKPQQKGLRLLCGSQVPVEVMGF
PKFADCWENFVDHEKPLSFNPFYKMLEELDKNSRAIKRRLERIKIPGVRAQQGRYMDILCDAEV

【化 1 2】

配列番号12トAPOBEC-3D

MNPQIRNPMERMYRDTFYDNFENEPILYGRSYTWLCYEVKIKRGRSNLLWDTGVFRGPVLPKRQSNHRQ
EVYFRFENHAEMCFLSWFCGNRLPANRRFQITWFVSWNPCLPCVVKVTKFLAEHPNVTLTISAARLYYY
RDRDRWVLLRLHKAGARVKIMDYEDFAYCWENFVCNEGQPFMPWYKFDDNYASLHRTLKEILRNPMEA
MYPHIFYFHFKNLLKACGRNESWLCFTMEVTKHHSVFRKRGVFRNQVDPETHCHAERCFLSWFCDDIL
SPNTNYEVTWYTSWSPCECAGEVAEFLARHSNVNLTIFARLCYFWDTDYQEGLCSLSQEGASVKIMG
YKDFVSCWKNFVYSDDPEFKPWKGLQTNFRLLKRRLREILQ

10

【化 1 3】

配列番号13トAPOBEC-1:

MTSEKGPSTGDPTLRRRIEPWEFDVFDYDPRELRKEACLLYEIKWGMSRKIWRSSGKNTTNHVEVNFIKK
FTSERDFHPSMSCSITWFLSWSPCEWESQAIREFLSRHPGVTLVIYVARLFWHMDQQNRQGLRDLVNSG
VTIQIMRASEYYHCWRNFVNYPGDEAHWPQYPLWMLYALELHCII LSLPPCLKISRWRQNHLTFFR
LHLQNCYQTI PPHILLATGLIHPSVAWR

20

【化 1 4】

配列番号14トADAT-2:

MEAKAAPKPAASGACSVSAEETEKMWEEAMHMAKEALENTEVPVGLMVYNNEVVGKGRNEVNQTKNAT
RHAEMVAIDQVLDWCRQSGKSPSEVFEHTVLYVTVEPCIMCAAALRLMKIPLVVYGCQNERFGGCGSVL
NIASADLPNTGR PFQCI PGYRAEEAVEMLKTFYKQENPNAPKSKVRKKECQKS

【化 1 5】

配列番号15トADAT-1:

MWTADEIAQLCYEHYGI RLPKKGKPEPNHEWTL LAAVVKIQSPADKACDTPDKPVQVTKEVSMGTGTK
CIGQSKMRKNGDILNDSHA EVIARRSFQRYLLHQLQLAATLKEDSIFVPGTQKGWKLRRDLIFVFFSS
HTPCGDASII PMLFEDQCCPVFRNWAHNS SVEASSNLEAPGNERKCEDPDS PVTKKMRLEPGTAARE
VTNGAAHQSFQKQSGPI SPGIHSCDLTVEGLATVTRIAPGSAKVIDVYRTGAKCVPGEAGDSGKPGA
AFHQVGLLRVKPGRGDRTRSMSCSDKMARWNVLGCQGALLMHLLEPIYLSAVVIGKCPYSQEAMQRAL
IGRCQNVSALPKGFGVQELKILQSDLLFEQSRSAVQAKRADSPGRLVPCGAAI SWSAVPEQPLDVTANG
FPQGTTKKTIGSLQARSQISKVELFRSFQKLLSRIARDKWP HSLRVQKLDTYQEYKEAASSYQEAWSTL
RKQVFGSWIRNPPDYHQFK

30

【0072】

一部の実施形態では、デアミナーゼはアデノシン・デアミナーゼである。一部の実施形態では、デアミナーゼはADATファミリーデアミナーゼである。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼ・バリエーションはTadAデアミナーゼである。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼ・バリエーションは、スタフィロコッカス・アウレウスTadA、バシラス・サブティリスTadA、サルモネラ・チフィリウムTadA、シェワネラ・プトレファシエンスTadA、ヘモフィルス・インフルエンザEF3031TadA、カウロバクター・クレセントラスTadA、もしくはジオバクター・サルファレデューセンスTadA、又はその断片である。一部の実施形態では、TadAデアミナーゼは大腸菌TadAデアミナーゼ(ecTadA)である。一部の実施形態では、TadAデアミナーゼは切断型大腸菌TadAデアミナーゼである。例えば、切断型ecTadAは、全長ecTadAと比べて、1つ又は複数のN末端アミノ酸を欠き得る。一部の実施形態

40

50

では、切断型 *ecTadA* は、全長 *ecTadA* と比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20のN末端アミノ酸残基を欠き得る。一部の実施形態では、切断型 *ecTadA* は、全長 *ecTadA* と比べて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20のC末端アミノ酸残基を欠き得る。一部の実施形態では、*TadA* デアミナーゼは *TadA*7.10* である。一部の実施形態では、*TadA* デアミナーゼは *TadA*8* バリエーションである。例えば、デアミナーゼは、国際PCT出願WO2018/027078、WO2017/070632、WO/2020/168132、WO/2021/050571において記載されており、それらの各々が、その全体において参照により本明細書中に組み入れられる。また、Komor, A.C., et al., “Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage” *Nature* 533, 420-424(2016); Gaudelli, N. M., et al., “Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage” *Nature* 551, 464-471(2017); Komor, A.C., et al., “Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity” *Science Advances* 3:eaao4774(2017)、及びRees, H.A., et al., “Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells.” *Nat Rev Genet.* 2018 Dec;19(12):770-788. doi: 10.1038/s41576-018-0059-1を参照のこと。それらの内容全体が、本明細書により、参照により本明細書中に組み入れられる。野生型 *TadA* (*wt*) アデノシン・デアミナーゼについての例示的なアミノ酸配列は、配列番号16として示される。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、配列番号16と少なくとも90%配列同一性を含む。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、配列番号16において番号付けされた位置82に修飾を含む。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼを含むアミノ酸配列は、V82S修飾を含み、それにおいて、位置82は、配列番号16において番号付けされているとおりである。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、配列番号16において番号付けされた位置166に修飾を含む。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、T166R修飾を含み、それにおいて、位置166は、配列番号16において番号付けされているとおりである。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、配列番号16において番号付けされた位置82及び166に修飾を含む。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼのアミノ酸配列は、V82S及びT166R修飾を含み、それにおいて、位置82及び166は、配列番号16において番号付けされているとおりである。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼ・バリエーションは、以下の改変の1つ又は複数をさらに含む：Y147T、Y147R、Q154S、Y123H、及びQ154R。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼ・バリエーションは、以下からなる群より選択される改変の組み合わせを含む：Y147T+Q154R；Y147T+Q154S；Y147R+Q154S；V82S+Q154S；V82S+Y147R；V82S+Q154R；V82S+Y123H；I76Y+V82S；V82S+Y123H+Y147T；V82S+Y123H+Y147R；V82S+Y123H+Q154R；Y147R+Q154R+Y123H；Y147R+Q154R+I76Y；Y147R+Q154R+T166R；Y123H+Y147R+Q154R+I76Y；V82S+Y123H+Y147R+Q154R；及びI76Y+V82S+Y123H+Y147R+Q154R。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼ・バリエーションは、*TadA*8.1*、*TadA*8.2*、*TadA*8.3*、*TadA*8.4*、*TadA*8.5*、*TadA*8.6*、*TadA*8.7*、*TadA*8.8*、*TadA*8.9*、*TadA*8.10*、*TadA*8.11*、*TadA*8.12*、*TadA*8.13*、*TadA*8.14*、*TadA*8.15*、*TadA*8.16*、*TadA*8.17*、*TadA*8.18*、*TadA*8.19*、*TadA*8.20*、*TadA*8.21*、T

a d A * 8 . 2 2、T a d A * 8 . 2 3、又はT a d A * 8 . 2 4である。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼは、上に記載されるように、単一の（例、単量体として提供される）T a d A バリエーションとして提供される。一部の実施形態では、アデノシン・デアミナーゼは、上に記載されるように、T a d A バリエーションに連結された野生型 T a d A (T a d A (w t)) のヘテロ二量体として提供される。

【化16】

配列番号16 > TadA配列

MSEVEFSHEYWMRHALTLAKRAWDEREVPVGVAVLVHNNRVIGEGWNRPIGRHDPTAHAEIMALRQGGGLV
MQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLHHPGMNHRVEITEGILA
DECAALLSDFFRMRREQEIKAKKAQSSD

10

【0073】

一部の実施形態では、デアミナーゼは、欠損CRISPR/CasヌクレアーゼのN末端に融合される。一部の実施形態では、デアミナーゼは、欠損CRISPR/CasヌクレアーゼのC末端に融合される。一部の実施形態では、欠損CRISPR/Casヌクレアーゼ及びデアミナーゼは、リンカーを介して融合される。一部の実施形態では、リンカーは、(GGGGS)n(配列番号17)、(G)n、(EAAAK)n(配列番号18)、(GGS)n、SGSETPGTSESATPES(配列番号19)モチーフを含む（例、Guilinger J P, Thompson D B, Liu D Rを参照のこと。追加の適切なリンカーモチーフ及びリンカー構成は、当業者には明らかであろう。一部の実施形態では、適切なリンカーモチーフ及び構成は、Chen et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality. Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65(10):1357-69において記載されるものを含み、その内容全体が、参照により本明細書中に組み入れられる。

20

【0074】

一部の実施形態では、融合タンパク質は追加の特色を含み得る。存在し得る他の例示的な特色は、局在化配列、例えば核局在化配列(NLS)、細胞質局在化配列、輸送配列、例えば核輸送配列など、又は他の局在化配列など、ならびに融合タンパク質の可溶化、精製、又は検出のために有用である配列タグである。適切な局在化シグナル配列及びタンパク質タグの配列が本明細書中に提供され、限定されないが、ビオチンカルボキシラーゼキャリアタンパク質(BCCP)タグ、mycタグ、カルモジュリンタグ、FLAGタグ、ヘマグルチニン(HA)タグ、ポリヒスチジンタグ（また、ヒスチジンタグ又はHisタグとして言及される）、マルトース結合タンパク質(MBP)タグ、nusタグ、グルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)タグ、緑色蛍光タンパク質(GFP)タグ、チオレドキシントグ、Sタグ、Softag(例、Softag 1、Softag 3)、strepタグ、ビオチンリガーゼタグ、FLASHタグ、V5タグ、及びSBPタグを含む。追加の適切な特色が、当業者には明らかであろう。

30

【0075】

種々の塩基編集酵素が当技術分野において公知であり（例、Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29を参照のこと）、典型的には、表A中に記載されているものを含む。

40

50

【表 1】

表A:一部の例示的な塩基編集酵素。

塩基編集 酵素	参考文献
ABEmax	Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29. pii: nbt.4172. doi: 10.1038/nbt.4172.
AncBE4max	Improving cytidine and adenine base-editing enzymes by expression optimization and ancestral reconstruction. Nat Biotechnol. 2018 May 29. pii: nbt.4172. doi: 10.1038/nbt.4172.
evoCDA1- BE4max-NG	Continuous evolution of base-editing enzymes with expanded target compatibility and improved activity. Nat Biotechnol. 2019 Jul 22. pii: 10.1038/s41587-019-0193-0. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0.
evoFERNY- BE4max	Continuous evolution of base-editing enzymes with expanded target compatibility and improved activity. Nat Biotechnol. 2019 Jul 22. pii: 10.1038/s41587-019-0193-0. doi: 10.1038/s41587-019-0193-0.
CBE-NRCH	Miller SM, Wang T, Randolph PB, Arbab M, Shen MW, Huang TP, Matuszek Z, Newby GA, Rees HA, Liu DR. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. Nat Biotechnol. 2020 Apr;38(4):471-481. doi: 10.1038/s41587-020-0412-8. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32042170; PMCID: PMC7145744.
CBE-SpG	Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science. 2020 Apr 17;368(6488):290-296. doi: 10.1126/science.aba8853. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32217751; PMCID: PMC7297043.
ABE-SpRY (配列番号18)	Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. Science. 2020 Apr 17;368(6488):290-296. doi: 10.1126/science.aba8853. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32217751; PMCID: PMC7297043.

10

20

30

40

50

CBE-SpRY (配列番号17)	Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, Kleinstiver BP. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. <i>Science</i> . 2020 Apr 17;368(6488):290-296. doi: 10.1126/science.aba8853. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32217751; PMCID: PMC7297043.	
ABE8e (配列番号37)	Lapinaite A, Knott GJ, Palumbo CM, Lin-Shiao E, Richter MF, Zhao KT, Beal PA, Liu DR, Doudna JA. DNA capture by a CRISPR-Cas9-guided adenine base editor. <i>Science</i> . 2020 Jul 31;369(6503):566-571. doi: 10.1126/science.abb1390. PMID: 32732424.	10
ABE8e-SpRY (配列番号38)	High-throughput continuous evolution of compact Cas9 variants targeting single-nucleotide-pyrimidine PAMs. Huang TP, Heins ZJ, Miller SM, Wong BG, Balivada PA, Wang T, Khalil AS, Liu DR. <i>Nat Biotechnol</i> . 2022 Sep 8. pii: 10.1038/s41587-022-01410-2. doi: 10.1038/s41587-022-01410-2. 10.1038/s41587-022-01410-2	20
ABE8e-NRCH (配列番号39)	pCMV-ABE8e-NRCH (Addgene plasmid # 165416 ; http://n2t.net/addgene:165416 ; RRID:Addgene_165416)	
NG-ABE8e (配列番号40)	Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. Richter MF, Zhao KT, Eton E, Lapinaite A, Newby GA, Thuronyi BW, Wilson C, Koblan LW, Zeng J, Bauer DE, Doudna JA and Liu DR. <i>Nat Biotechnol</i> (2020)	30

【化 1 7】

配列番号17> CBE-SpRYのアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRVSSETGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELKTCCLLYEINWGGRHSIWRHTSQN
 TNKHVEVNFIEKFTTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAITEFLSRYPHVTLFYIARLYHHADPRNRQGLR
 DLISSGVTIQIMTEQESGYCWRNFVNYSPSNEAHWPYPHLLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQPQLTFFT
 IALQSCHYQRLPPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAVIT
 DEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLRRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF
 FHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEG
 DLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLG
 LTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI
 KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNRED
 LLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTFRIPIYVGPLARGNSRFAMWTRKSEET
 ITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKA
 IVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLT
 LTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFANRNFQOLI
 HDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQK
 GQKNSRERMKRIEEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFL
 KDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLV
 ETRQITKHVAQIILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENNYHHAHDAYLNAVVGTA
 IKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI
 VWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKKEVQTTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKGGLFWPTVAYSVLVVA
 KVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSSEKFNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAKQLQK
 GNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEEQISEFSKRVI LADANLDKVL SAYNKH
 RDKPIREQAENI IHLFTLTRLGAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDSGGS
 GSGGGSTNLSDII EKETGKQLVIQESI LMLPEEVEEVI GNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWAL
 VIQDSNGENKI KMLSGGSGGSGGSTNLSDII EKETGKQLVIQESI LMLPEEVEEVI GNKPESDILVHTAYDESTD
 ENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKI KMLSGGSKRTADGSEFEPKRRKRVGGGGSGATNFSLLKQAGDVEEN
 PGPVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCF
 SRYPDHMKQHDFKSSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN
 SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQONTPIGDGPVLLPDNHVYSTQSALS KDPNEKRDMVLL
 EFVTAAGITLGMDELYK

10

20

30

40

50

【化 1 8】

配列番号18> ABE— SpRYのアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVHNNRVI GEGWNRPIGRHDPTAH
 AEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGARDAKTGAAGSLMDVLLHHPGMNHRVEI
 TEGILADECALLSDFFRMRQEIKAQKKAQSSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSSSEVEFSHE
 YWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVHNNRVI GEGWNRPIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTF
 EPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNAKTGAAGSLMDVLLHYPGMNRHVEITEGILADECALLCYFFRMRQVFNAQ
 KKAQSSSTDSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAI GTNSVGVAVITDEYKVP SKKFKVLG
 NTDHRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDK
 KHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYLAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFI
 QLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAED
 AKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLK
 ALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIP
 HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGA
 SAQSFIERM TNFDKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV
 KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKKI IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERL
 KTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKA
 QVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEE
 GIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDQVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSD
 KNRGKSDNVPSEEVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKQVLVETRQITKHVAQILD
 SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYG
 DYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKV
 LSMPQVNI VVKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKYYGGFLWPTVAYSVLVAKVEK GKSKKLKSVK
 ELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAKQLKGNELALPSKYVNF
 LYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVI LADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IH
 LFTLTRLGAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKPK
 RKVSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICT
 TGKLPVWPPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIE
 LKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDGVSQ LADHYQONTPI GDGPVLLPDNH
 YLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYKSGGSPKKKRKV

10

20

【化 1 9】

配列番号37> ABE8eのアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVHNNRVI GEGWNRPIGLHDPTAH
 AEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTLEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEI
 TEGILADECALLCDFYRMRQVFNAQKKAQSSINS GGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGL
 AIGTNSVGVAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRKRTARRRYTRRKNRICYLQEI
 FSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLRILIYLA
 HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEK
 NGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN
 TEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
 GTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGN
 SRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGASASQFIERM TNFDKNLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGM
 RKPFAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKKI IKDKDFLDN
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLK
 SDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
 VIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS
 DYDQVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
 ELDKAGFIKQVLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVIENNYHHA
 HDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK
 RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKYYGGF
 DSPTVAYSVLVAKVEK GKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
 RKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNF LYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVI LAD
 ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTLNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETR
 IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKPKKRKVSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPI LVELDGDV
 NGHKFSVSGEGEGDATYKGLTLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
 IFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI E
 DGSVQLADHYQONTPI GDGPVLLPDNH YLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYKSGGSPKKKR
 KV

30

40

50

【化 2 0】

配列番号38> ABE8e-SpRYのアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRAIGLHDPTAH
 AEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEI
 TEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESGGSSGGSDKKYSIGL
 AIGTNSVGWAVITDEYKVPSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTLRKRTARRRYTRRKNRICYLQE
 IFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALA
 HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
 NGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN
 TEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
 GTEELLVKLNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGN
 SRFAMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGM
 RKPAPFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLK
 SDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
 VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS
 DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRKGSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
 ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHA
 HDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK
 RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGF
 LWPTVAYSVLVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
 RKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFYLA SHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVI LAD
 ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTRLGAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQ SITGLYETR
 IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKR KVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILEVELGDV
 NGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
 IFFKDDGNKYTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI E
 DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELKYSGGSPKKKR
 KV

10

20

【化 2 1】

配列番号39> ABE8e-NRCHのアミノ酸配列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALLAKRARDEREVPVGAVLVLNRRVIGEGWNRAIGLHDPTAH
 AEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIGRVVFGVRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEI
 TEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESGGSSGGSDKKYSIGL
 TIGTNSVGWAVITDEYKVPSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQE
 IFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALA
 HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKK
 NGLFGNLIALLSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN
 TEITKAPLSASMVKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
 GTEELLVKLNREDLLRQRTFDNGIIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGN
 SRFAMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGM
 RKPAPFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDN
 EENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYAHLFDDKVMKQLKRLRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLK
 SDGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGGHKPENI
 VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS
 DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRKGSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
 ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHA
 HDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK
 RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKGNSDKLIARKKDWDPKKYGGF
 NSPTVAYSVLVAKVEKGSKKLKS VKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
 RKRMLASAGVLQKGNELALPSKYVNFYLA SHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVI LAD
 ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTLNLGAPAAFYFDTTINRKQYNTTKEVLDATLIHQ SITGLYETR
 IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPKKR KVGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPILEVELGDV
 NGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
 IFFKDDGNKYTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI E
 DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELKYSGGSPKKKR
 KV

30

40

50

【化 2 2】

配列番号40> NG-ABE8eのアミノ酸配列

```

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRRARDEREVPGAVLVLNNRVI GEGWNRAI GLHDPTAH
AEIMALRQGGGLVMQNYRLIDATLYVT FEP CVMCAGAMIHSRI GRVVFVGRNSKRGAAAGSLMNVLNYPGMNHRVEI
TEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQKKAQSSINS GSGSSGGSSGSETPGTSESATP ESSGGSSGGSDKKYSIGL
AIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSI KKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRI CYLQE
IFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPI FGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADRLIYLALA
HMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRENLI AQLPGEKK
NGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI LLSDILRVN
TEITKAPLSASMI KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMD
GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFPFLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGN
SRFAWMTRKSEETITPWNFE EVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVL PKHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGM
RKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL LKI IKDKDFLDN
EENEDILEDIVLTLTLFEDREMI EERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRK LINGIRDKQSGKTILD FLK
SDGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENI
VIEMARENQTTQKGQNSRERMKRI EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS
DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRKGSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLS
ELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHA
HDAYLNAVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK
RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPK KYGGF
VSP TVAYSVLVAKVEK GKSKLKS VKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENG
RKRLASARFLQKGNELALPSKYVNF LYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVI LAD
ANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPRAF KYFDTTIDRKVYRSTKEVLDATLIHQ SITGLYETR
IDLSQLGGDSGGSKRTADGSEFEPK KKRKVSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMVSKGEELFTGVVPI LVELDGDV
NGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
IFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI E
DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITLGMDELX

```

10

20

【0076】

本明細書中に開示される遺伝子編集プラットフォームの第2の成分は、赤血球特異的 BCL11A エンハンサーの +55 kb 領域において位置付けられる少なくとも1つの標的配列に塩基編集酵素をガイドするために適切な少なくとも1つのガイドRNA分子からなる。本発明のガイドRNA分子は、このように、ターゲティング特異性を提供するためのガイド配列を含む。それは、赤血球特異的 BCL11A エンハンサーの +55 kb 領域中

の、予め選択された目的の標的部位に相補的で、それへのハイブリダイゼーションが可能である領域を含む。本開示によれば、ガイドRNAは、ATF4 結合部位を標的化し、当該部位を編集し、このように、その結合部位へのATF4の結合を破壊するようにする。

30

【0077】

一部の実施形態では、このガイド配列は、約10ヌクレオチドから約25を上回るヌクレオチドを含むことができる。例えば、ガイド配列と、対応する標的部位配列の間での塩基対合の領域は、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25、又は25を上回るヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態では、ガイド配列は、約17~20ヌクレオチド長、例えば20ヌクレオチドなどである。

40

【0078】

典型的には、ソフトウェアプログラムを使用して、所望のガイド配列長及び特定のCRISPR酵素についてのCRISPRモチーフ配列(PAM)に基づいて、DNA核分子の両鎖上の候補CRISPR標的配列を同定する。適切な標的核酸を選択するための1つの要件は、それが3' PAM部位/配列を有することである。各々の標的配列及びその対応するPAM部位/配列は、本明細書中ではCas標的部位として言及される。II型CRISPRシステムは、最も十分に特徴付けられたシステムの1つであり、標的切断に影響を及ぼすために、Cas 9タンパク質及び標的配列に相補的なガイドRNAだけを必要とする。例えば、PAM配列NGGを伴うS.ピオゲネスからのCas 9についての標的部位は、入力配列で及び入力の逆相補体で5'-Nx-NGG-3'について検索する

50

ことにより同定され得る。DNA 標的部位のゲノム中での複数の発生は、非特異的ゲノム編集に導き得るため、全ての潜在的な部位を同定した後、プログラムは、それらが関連する参照ゲノム中に現れる回数に基づいて配列をフィルタリング除去する。配列特異性が、「シード」配列、例えば、PAM 配列自体を含む、PAM 配列から 5' の 11 ~ 12 bp などにより決定される CRISPR 酵素については、フィルタリング工程はシード配列に基づいてもよい。このように、追加のゲノム遺伝子座での編集を避けるために、結果は、関連するゲノム中のシード：PAM 配列の発生の数に基づいてフィルタリングされる。使用者は、シード配列の長さを選ぶことが可能であり得る。使用者はまた、フィルターを通過する目的のために、ゲノム中のシード：PAM 配列の発生の数を特定することができる。デフォルトは、固有の配列をスクリーニングすることである。濾過レベルは、シード配列の長さ及びゲノム中での配列の発生の数の両方を変化させることにより改変される。プログラムは、追加的に又は代替的に、同定された標的配列の逆相補体を提供することにより、報告された標的配列に相補的なガイド配列の配列を提供し得る。配列選択を最適化するための方法及びアルゴリズムのさらなる詳細は、米国特許出願第 61 / 836 , 080 号において見出されることができ；参照により本明細書中に組み入れられる。

10

【0079】

一部の実施形態では、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び以下を導入するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子を含む遺伝子編集プラットフォーム：

- 配列番号 45 の第 1 のシチジン残基における 1 つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
- 配列番号 45 の第 2 のシチジン残基における 1 つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
- 配列番号 45 の第 3 のシチジン残基における 1 つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
- 第 4 のシチジン配列番号 45 における 1 つの C > T 変異 (T T G C A T C A T C C) 。

20

【0080】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び ATF4 結合部位の + 55 C B E I 編集プロファイルを生成するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子 (即ち、T T G I A T I A T I I (配列番号 32)) を含む。

30

【0081】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) シチジン塩基編集酵素及び b) 及び ATF4 結合部位において + 55 C B E I I 編集プロファイルを生成するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子 (即ち、T T G C A T I A T I I (配列番号 33)) を含む。

【0082】

一部の実施形態では、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び以下を導入するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子を含む遺伝子編集プラットフォーム：

- 配列番号 45 における第 1 のアデニン残基における 1 つの A > G 変異 (T T G C A T C A T C C) 及び / 又は
- 配列番号 45 の第 2 のアデニン残基における 1 つの A > G 変異 (T T G C A T C A T C C) 。

40

【0083】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び ATF4 結合部位において + 55 A B E I I プロファイルを生成するために適切な少なくとも 1 つのガイド RNA 分子 (T T G C A T C G T C C (配列番号 35)) を含む。

【0084】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) アデニン塩基編集酵素及び b) 及び ATF4 結合部位において + 55 A B E I I I プロファイルを生成するために

50

適切な少なくとも1つのガイドRNA分子（TTGCGTCTCC（配列番号46））を含む。

【0085】

一部の実施形態では、ガイドRNAは、表1から選択される配列を標的化する（実施例を参照のこと）。

【0086】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) ABE-SpRY又はCBE-SpRYである塩基編集酵素及びb) 及び表1又は表4中で選択される1つの配列を標的化する少なくとも1つのガイドRNA分子を含む。

【0087】

一部の実施形態では、遺伝子編集プラットフォームは、a) 塩基編集酵素及びb) 及び表4中に記載される組み合わせに従って選択される少なくとも1つのガイドRNA分子を含む。

【0088】

本発明のガイドRNA分子は、細胞ベースの発現、インビトロ転写、及び化学合成を含む、当技術分野において公知の種々の方法により作製することができる。TC-RNA化学を使用して比較的長いRNA（200mer又はそれ以上の長さ）を化学的に合成する能力（例、米国特許第8,202,983号を参照のこと）によって、基本的な4つのリボヌクレオチド（A、C、G、U）により可能になるものを上回る特別な特色を伴うRNAを産生することが可能になる。特に、本発明のRNA分子は、当技術分野において公知の宿主細胞系又はインビトロ翻訳転写系を使用した組換え技術を用いて作製することができる。そのような系及び技術の詳細は、例えば、WO2014144761、WO2014144592、WO2013176772、US20140273226、及びUS20140273233において見出すことができ、それらの内容は、それらの全体において参照により本明細書中に組み入れられる。

【0089】

一部の実施形態では、ガイドRNA分子は、1つ又は複数の修飾を含み得る。そのような修飾は、少なくとも1つの非天然ヌクレオチド、もしくは修飾ヌクレオチド、又はそれらの類似体の包含を含み得る。修飾ヌクレオチドは、リボース、リン酸、及び/又は塩基部分で修飾され得る。修飾ヌクレオチドは、2'-O-メチル類似体、2'-デオキシ類似体、又は2'-フルオロ類似体を含み得る。核酸骨格は修飾されていてもよく、例えば、ホスホロチオエート骨格が使用されてもよい。ロックド核酸（LNA）又は架橋核酸（BNA）の使用がまた、可能であり得る。修飾塩基のさらなる例は、限定されないが、2-アミノプリン、5-プロモウリジン、プソイドウリジン、イノシン、7-メチルグアノシンを含む。

【0090】

一部の実施形態では、複数のガイドRNA分子は、赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55kb領域中の複数の配列を標的化するように設計される。一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子編集プラットフォームは、このように、本明細書中に開示されるように、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、又は20のガイドRNA分子を含む。

【0091】

一部の実施形態では、複数のガイドRNA分子を伴う複数の塩基編集酵素が、赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55kb領域中の複数の配列を標的化するために設計される。一部の実施形態では、本明細書中に開示される遺伝子編集プラットフォームは、このように、本明細書中に開示されるように、2、3、又は4つの塩基編集酵素及び2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、又は20のRNA分子を含む。

【0092】

一部の実施形態では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの異なる成分は、1つ又は

10

20

30

40

50

複数の発現ベクターからの発現を通じて真核細胞に提供される。例えば、ガイドRNA分子又は塩基編集酵素をコードする核酸は、それらを真核細胞中に導入するために1つ又は複数のベクター中にクローニングすることができる。ベクターは、典型的には、本明細書中に開示されるガイドRNA分子又は塩基編集酵素をコードする核酸の保存又は操作のための、原核生物ベクター、例えば、プラスミド、又はシャトルベクター、又は昆虫ベクターである。好ましくは、核酸は単離及び/又は精製される。このように、本発明は、上に記載されるガイドRNA分子又は塩基編集酵素の1つ又は複数を含む配列を有する組換え構築物又はベクターを提供する。構築物の例は、本発明の核酸配列が順方向又は逆方向において挿入されたベクター、例えばプラスミド又はウイルスベクターなどを含む。一部の実施形態では、構築物は調節配列をさらに含む。「調節配列」は、プロモーター、

10

【0093】

調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現に向ける配列ならびに誘導性調節配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換、トランスフェクト、又は感染させる真核細胞の選択、所望の発現レベルなどの因子に依存し得る。多数の適切なベクター及びプロモーターが当業者に公知であり、市販されている。真核生物宿主との使用のための適したクローニング及び発現ベクターがまた、例えば、Sambrookら(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)において記載されている。ベクターは自律複製又は宿主DNA中への組み込みが可能であり得る。ベクターはまた、発現を増幅するための適した配列を含み得る。また、発現ベクターは、好ましくは、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質、例えば真核細胞培養物についてのジヒドロ葉酸レダクターゼもしくはネオマイシン耐性、又は例えば大腸菌におけるテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性などを提供するのための1つ又は複数の選択マーカー遺伝子を含む。外来ヌクレオチド配列を宿主細胞中に導入するための当技術分野において公知の手順のいずれかを使用することができる。例は、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリブレン、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リボソーム、マイクロインジェクション、ネイキッドDNA、プラスミドベクター、ウイルスベクター(エピソーム及び組み込みの両方)、及びクローン化されたゲノムDNA、cDNA、合成DNA、又は他の外来遺伝物質を宿主細胞中に導入するための他の周知の方法の使用を含む。

20

30

【0094】

一部の実施形態では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの異なる成分は、RNAコード化システムの使用を通じて細胞の集団に提供される。例えば、CBE-SpRY及びABE-SpRYは、タンパク質をコードするmRNA配列、例えばそれぞれ配列番号17及び配列番号18などにより提供される。特に、当該mRNAの配列は、配列番号30及び配列番号31として提供される。特に、塩基編集システムは、Jiang, T., Henderson, J.M., Coote, K. et al. *Chemical modifications of adenine base editor mRNA and guide RNA expand its application scope. Nat Commun* 11, 1979(2020)において記載されるように、修飾されたガイドRNAと一緒に、化学的に修飾されたmRNAにコードされたアデニン又はシチジン塩基エディターの使用を通じて、細胞の集団に提供され得る。特に、操作RNAにコードされた塩基編集酵素(例、ABE)システムは、塩基編集酵素をコードしたmRNA及びガイドRNAの両方に種々の化学修飾を導入することにより調製される。特に、当該修飾は、5-メトキシウリジンをを用いて修飾されたウリジン枯渇mRNAに存する：同義コドンを、コード配列を改変することなく可能な限りウリジンを枯渇させるために導入してもよく、全ての残りのウリジンを5-メトキシウリジンで置換した。当該最適化された塩基編集システムは、DNAコード化システムと比較して、一部のゲノム部位でより高い編集効率を示す。修飾mRNAをカプセル化し、RNAを脂質ナノ粒子(LNP)中にガイドして、脂質ナノ粒子(LNP)媒介性送達を可能にすることも可能である。

40

【0095】

50

一部の実施形態では、本発明の遺伝子編集プラットフォームの異なる成分が、リボ核タンパク質（RNP）複合体の使用を通じて細胞の集団に提供される。例えば、塩基編集酵素は、1つ又は複数のガイドRNA分子と予め複合体化して、リボ核タンパク質（RNP）複合体を形成することができる。RNP複合体を、このように、真核細胞中に導入することができる。RNP複合体の導入は、時間調整することができる。細胞は、細胞周期のG1、S、及び/又はM期で他の細胞と同期化することができる。RNP送達は、mRNA、DNA、又はウイルス送達に関連付けられる落とし穴の多くを回避する。典型的には、RNP複合体は、単に、タンパク質（即ち、塩基編集酵素）及び1つ又は複数のガイドRNA分子を適した緩衝液中で混合することにより産生される。この混合物を、エレクトロポレーション前に室温で5～10分間にわたりインキュベートする。エレクトロポレーションは、電場を、細胞膜の透過性を増加するために、1つ又は複数の細胞に適用する送達技術である。一部の実施形態では、ゲノム編集効率は、トランスフェクション・エンハンサー・オリゴヌクレオチドを加えることにより改善することができる。

10

【0096】

一部の実施形態では、複数の連続的なトランスフェクションが、細胞における変異誘発の所望のレベルに達するために実施される。

【0097】

本発明のさらなる目的は、それを必要とする対象におけるヘモグロビン症を処置する方法であって、この方法は、上に記載される方法により得られた治療有効量の真核細胞の集団を移植することを含む。

20

【0098】

一部の実施形態では、細胞の集団は対象に対して自家性であり、細胞の集団が、同じ対象から由来することを意味する。

【0099】

一部の実施形態では、ヘモグロビン症は鎌状赤血球症である。

【0100】

一部の実施形態では、ヘモグロビン症はサラセミアである。

【0101】

キット

本発明はさらに、変異誘発を実施するための、本明細書中に開示される遺伝子編集プラットフォームの全ての成分を含む、上に記載される方法を実施するための試薬を含むキットを提供する。その目的に対して、本明細書中に開示される方法のための、1つ又は複数の反応成分、例えば、ガイドRNA分子、及び塩基編集酵素をコードする核酸分子を、使用のためのキットの形態において供給することができる。一部の実施形態では、キットは、1つ又は複数の塩基編集酵素及び1つ又は複数のガイドRNA分子を含む。一部の実施形態では、キットは、1つ又は複数の他の反応成分を含むことができる。一部の実施形態では、適した量の1つ又は複数の反応成分が、1つ又は複数の容器中で提供される、又は基質上に保持される。キットの追加の成分の例は、限定されないが、1つ又は複数の宿主細胞、外来ヌクレオチド配列を宿主細胞中に導入するための1つ又は複数の試薬、ガイドRNA又は塩基編集酵素の発現を検出する、あるいは標的核酸の状態を検証するための1つ又は複数の試薬（例、プローブ又はPCRプライマー）、及び反応用の緩衝液又は培養培地を含む。キットはまた、以下の成分の1つ又は複数を含み得る：支持体、終結試薬、修飾試薬又は消化試薬、浸透圧調節物質、及び検出のための装置。使用される成分は、多様な形態において提供することができる。例えば、成分（例、酵素、RNA、プローブ及び/又はプライマー）は、水溶液中に懸濁する、あるいは凍結・乾燥又は凍結乾燥した粉末、ペレット、又はビーズとして懸濁することができる。後者の場合では、成分は、再構成される場合、アッセイにおける使用のための成分の完全な混合物を形成する。本発明のキットは、任意の適切な温度で提供することができる。例えば、タンパク質成分又はそれらの複合体を液体中に含むキットの保存のために、それらは、0未満、好ましくは-20未満、又はそうでなければ冷凍状態において提供及び維持されることが好ましい。キ

30

40

50

ットはまた、容器又は容器の組み合わせを保持するための包装材料を含むことができる。そのようなキット及びシステムのための典型的な包装材料は、反応成分又は検出プローブを多様な構成中で（例、バイアル、マイクロタイタープレートウェル、マイクロアレイ、及び同様のものの中で）保持する固体マトリックス（例、ガラス、プラスチック、紙、ホイル、微粒子及び同様のもの）を含む。キットは、成分の使用のために有形の形態において記録された説明書をさらに含み得る。

【0102】

本発明は、以下の図面及び実施例によりさらに例証される。しかし、これらの実施例及び図面は、本発明の範囲を限定するとして任意の方法において解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】図1．赤血球特異的 BCL11A エンハンサーの +55 kb 領域を標的化するための sgRNA 設計。A～B．染色体2上の BCL11A 遺伝子の一部の模式図であって、エクソン2、3、及び4（Ex2、3、及び4）ならびに DNase I 高感受性部位 +62 kb、+58 kb、及び +55 kb を描写する。赤血球特異的 BCL11A エンハンサーの +55 kb 領域の配列が描写されている。ATF4 転写アクチベーター BS は太字で強調されている。塩基編集酵素と使用される sgRNA の標的配列が報告されており（矢印を用いて強調）、それらは鎖方向において結合する DNA 配列と整列される。楕円形状は転写アクチベーター及び ATF4 を示す。

【図2】図2．SCD HSPC 由来赤芽球における赤血球特異的 BCL11A エンハンサーの RNA 媒介性塩基編集。A．SCD HSPC における塩基編集実験のために使用される実験プロトコル。塩基エディター mRNA 及び sgRNA を SCD HSPC において同時トランスフェクトした。細胞は、三相赤血球分化プロトコルを使用して成熟 RBC に分化する、又は赤血球（BFU-E）及び顆粒単球（CFU-GM）分化をサポートする条件下でメチルセルロース含有培地中に置かれた。B．+55 kb 領域中で編集され、サンガー配列決定に供された SCD HSPC から分化した赤芽球における、EditR ソフトウェアにより計算された、C-G から T-A 又は A-T から G-C 塩基編集効率。データは平均値 ± SEM として表現される（n = 3 の生物学的に独立した実験、3人のドナー）。CBE I 及び II プロファイルは、CBE - SpRY ならびに ATF4__BS__1 及び ATF4__BS__2 sgRNA によりそれぞれ生成され、ABE I 及び II プロファイルは、ABE - SpRY ならびに ATF4__BS__1 及び ATF4__BS__2 sgRNA によりそれぞれ生成された。D．サンガー配列決定に供されたコントロールサンプル、塩基編集サンプル及び Cas9 編集サンプルにおける、TIDE 分析により測定された Indel の頻度。データは平均値 ± SEM として表現される（n = 3 の生物学的に独立した実験、3人のドナー）。**** p 0.0001（通常の一元配置分散分析）。

【図3】図3．SCD HSPC における BCL11A エンハンサーの RNA 媒介性塩基編集は、前駆細胞に影響を及ぼさず、赤血球系コロニーにおける HbF を再活性化する。A．サンガー配列決定に供された BFU-E 及び CFU-GM プールコロニーにおける、EditR ソフトウェアにより計算された、C-G から T-A 又は A-T から G-C 塩基編集効率。+55 kb 領域中で編集された SCD HSPC から由来する BFU-E 及び CFU-GM。データは平均値 ± SEM として表現される（n = 3 の生物学的に独立した実験、3人のドナー）。+55 : CBE I 及び II プロファイルは、CBE - SpRY により生成され、ABE I 及び II プロファイルは、ABE - SpRY により生成された。B～C．サンガー配列決定に供されたコントロール、塩基編集ならびに Cas9 編集 BFU-E (B) 及び CFU-GM (C) プールサンプルについて、TIDE 分析により測定された Indel の頻度。データは平均値 ± SEM として表現される（n = 3 の生物学的に独立した実験、3人のドナー）。*** p 0.001 ; **** p 0.0001（通常の一元配置分散分析）。D．コントロールサンプル及び編集サンプルについての CFC 頻度。データは平均値 ± SEM として表現される（n = 3 の生物学的に独立

10

20

30

40

50

した実験、3人のドナー)。E. BFU-EにおけるCE-HPLCによるHbF及びHbSの分析。本発明者らは、全Hb四量体にわたる各々のHb型のパーセンテージを計算した。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。F. BFU-EにおけるRP-HPLCにより測定された α -グロビン鎖の発現。 α -グロビン発現は、 α -グロビンに対して標準化された。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。

【図4】図4. 赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊は、SCDHSPCの赤血球分化過程に影響を及ぼさない。A. コントロール(未処理、又はTE緩衝液を用いた偽トランスフェクト、又はBE mRNAだけを用いたトランスフェクト、又は無関係なAAVS1遺伝子座を標的化するBE mRNA及びsgRNAを用いたトランスフェクト)及び編集サンプルにおけるDRAQ5核染色のフローサイトメトリー分析により測定された、赤血球分化の6、13、16、及び19日目での除核細胞の頻度。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。B~D. フローサイトメトリー分析により測定された、赤血球分化の6、13、及び19日目でのCD71+(B)、CD36+(C)、及びGPA+(D)細胞の頻度。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。E. フローサイトメトリー分析により測定された、赤血球分化の6、13、及び19日目での7AAD-/GPA+細胞における α 4-インテグリン+、BAND3+、及び α 4-インテグリン+/BAND3+の頻度。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。

【図5】図5. 赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊は、HbFを再活性化し、塩基編集されたSCDHSPCから由来するRBCにおける鎌状化表現型を寛解させる。A. SCDH患者RBCにおけるCE-HPLCによるHbF及びHbSの分析。全Hb四量体にわたる各々のHb型のパーセンテージを計算した。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。* p 0.05; *** p 0.001(二元配置分散分析)。B. 赤血球分化13日目でのSCDH患者赤芽球における α S-及び α -グロビンmRNAレベルのRT-qPCR分析。 α S-及び α -グロビンmRNA発現を α -グロビンmRNAに対して標準化し、 α S-+ α -グロビンmRNAのパーセンテージとして表現した。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。** p 0.01; **** p 0.0001(二元配置分散分析)。C. 赤血球分化の終了時でのSCDH患者RBCにおけるRP-HPLCにより測定された α -グロビン鎖の発現。 α -グロビン発現は、 α -グロビンに対して標準化された。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。D. コントロールサンプル及び編集サンプルについてのGPA+集団におけるHbF及びHbS発現細胞の頻度。データは平均値±SEMとして表現される(n=3の生物学的に独立した実験、3人のドナー)。E. コントロールサンプル及び編集サンプルにおけるO₂欠乏時の鎌状化細胞の頻度。データは平均値±SEMとして表現される(n=2の生物学的に独立した実験、2人のドナー)。

【図6】図6. 単一赤血球前駆細胞におけるHbFの再活性化。A. 異なる編集プロファイル及び単一对立遺伝子(mono)又は二対立遺伝子(bi)編集のいずれかを持つ単一BFU-EコロニーにおけるHBGMRNA相対発現(Ctrl n=23; CBE I mono n=9; CBE I bi n=11; CBE II mono n=4; CBE II bi n=11; ABE I mono n=9; ABE I bi n=15; ABE II mono n=6; ABE II bi n=2; 1ドナー)。HBGMRNA発現をHBA1/2 mRNAに対して標準化し、全HBB+HBGMRNAのパーセンテージとして表現した。TE緩衝液を用いて偽トランスフェクトされた、又はBE mRNAだけを用いてトランスフェクトされた、又は無関係なAAVS1遺伝子座を標的化するBE mRNA及びsgRNAを用いてトランスフェクトされたSCDHSPCから由来するBFU-Eを、ネガティブコントロールとして使用し

10

20

30

40

50

た (Ctrl)。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (一元配置分散分析)。B. 異なる編集プロファイルを持つ単一BFU-EコロニーにおけるHBG mRNA 相対発現及び塩基編集効率の間での相関関係 (Ctrl $n = 23$; CBE I $n = 20$; CBE II $n = 15$; ABE I $n = 24$; ABE II $n = 8$; 1ドナー)。HBG mRNA発現をHBA1/2 mRNAに対して標準化し、全HBB+HBG mRNAのパーセンテージとして表現した。塩基編集効率は、サンガー配列決定に供されたサンプルにおいてEditRソフトウェアにより計算された。TE緩衝液を用いて偽トランスフェクトされた、又はBE mRNAだけを用いてトランスフェクトされた、又は無関係なAAVS1遺伝子座を標的化するBE mRNA及びsgRNAを用いてトランスフェクトされたSCD HSPCから由来するBFU-Eをネガティブコントロールとして使用した。ns $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (CBE I: $R^2 = 0.3989$, $Y = 0.4685 * X + 29.98$, $p < 0.0001$ 非ゼロ傾斜の有意性; CBE II: $R^2 = 0.4072$, $Y = 0.3532 * X + 31.75$, $p < 0.0001$ 非ゼロ傾斜の有意性; ABE I: $R^2 = 0.07206$, $Y = 0.1431 * X + 31.24$, $p = 0.0651$ 非ゼロ傾斜の有意性; ABE II: $R^2 = 0.4710$, $Y = 0.7134 * X + 30.87$, $p < 0.0001$ 非ゼロ傾斜の有意性; 多重t検定)。

10

【図7】図7. AncBE4max-OPTを用いたSCD HSPC由来細胞における赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊。HSPC培地で培養され、サンガー配列決定に供された細胞から得られたDNAサンプルにおける、EditRソフトウェアにより計算された、C-GからT-A塩基編集効率。SCD HSPCは、CBE-SpRY又はAncBE4max-OPTのいずれかを用いて+55kb領域中で編集された。データは単一値として表現される ($n = 1$ ドナー)。

20

【図8】図8. 高度に加工性のABEを伴うSCD HSPC由来細胞における赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊。A. サンガー配列決定に供されたSCD HSPC由来細胞 (赤血球系液体培養、BFU-Eコロニー、CFU-GMコロニー) における、EditRソフトウェアにより計算された、A-TからG-C塩基編集効率。SCD HSPCは、ABE8eを用いて+55 kb領域中で編集された。データは平均値 \pm SEMとして表現される ($n = 2$ の生物学的に独立した実験、2人のドナー)。B. SCD由来BFU-EにおけるCE-HPLCによるHbF及びHbSの分析。全Hb四量体にわたる各々のHb型のパーセンテージを計算した。データは平均値 \pm SEMとして表現される ($n = 2$ の生物学的に独立した実験、2人のドナー)。**** $p < 0.0001$ (二元配置分散分析)。

30

【0104】

実施例：

方法

HSPC精製及び培養

本発明者らは、SCD患者からヒト非動員末梢血CD34+ HSPCを得た。研究目的のために適格なSCDサンプルは、「Hopital Necker-Enfants malades」病院 (パリ、フランス) から得られた。書面によるインフォームドコンセントを、全ての成人対象から得た。全ての実験は、ヘルシンキ宣言に従って実施された。この試験は、地域治験審査委員会により承認された (参考文献: DC 2014-2272、CPP Ile-de-France II「Hopital Necker-Enfants malades」)。HSPCは、CD34 Micro Bead Kit (Miltenyi Biotec) を用いた免疫染色後、AutoMACS (Miltenyi Biotec) を用いた免疫磁気選択により精製された。トランスフェクション前の48時間に、CD34+細胞を解凍し、ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco)、250nM StemRegenin1 (STEMCELL Technologies)、ならびに以下の組換えヒトサイトカイン (PeproTech): ヒト幹細胞因子 (SCF) (300ng/ml)、Flt-3L (300ng/ml)、トロンプオエチン (TPO) (100ng/ml)、及びインターロイキン-3 (

40

50

IL-3) (60 ng/ml) を添加したStemSpan (STEMCELL Technologies) を含む「HSPC培地」中で 5×10^5 個細胞/mlの濃度で培養した。

【0105】

プラスミド

この試験において使用されたプラスミドは以下である：

pCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFP (RTW5133) (Addgene #139999)、

pCMV-T7-SpRY-P2A-EGFP (RTW4830) (Addgene #139989)。

pCMV_AncBE4max_P2A_GFP (Addgene #112100)、

ABE8e (Addgene #138489)。

HBB遺伝子の2コピーの3'非翻訳領域(UTR)及び96アデニンのポリA配列を含むDNAフラグメント(3'UTR+ポリA)が、Genscriptにより購入された。同様に、pCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFPのウリジン枯渴コード配列を含む別のDNA断片を作製した(CBE-SpRY_U-del)。

CBE-SpRY-OPTプラスミドは、pCAG-CBE4max-SpRY-P2A-EGFP (Addgene #140003) プラスミド中に3'UTR+ポリAフラグメントを挿入することにより、及びCBE4max-SpRYコード配列をCBE-SpRY_U-delフラグメントで置換することにより作製された。CBE-SpRY-OPTプラスミドは、効率的なキャッピングを可能にするGntが続くT7プロモーターを含む。

ABE-SpRY-OPTプラスミドは、pCMV-T7-SpRY-P2A-EGFP (RTW4830) (Addgene #139989) プラスミド中に3'UTR+ポリAフラグメントを挿入することにより作製された。

AncBE4max-OPTプラスミドは、NGG PAMの認識を可能にするCBE-SpRY-OPTプラスミドのCas9ニッカーゼのPAM同定ドメイン中に点変異を挿入することにより、及び酵素の祖先の再構成を可能にするCBE-SpRY-OPTプラスミドのデアミナーゼドメイン中に点変異を挿入することにより作製された。

【0106】

sgRNA設計

本発明者らは、BCL11Aの+55 kb領域を標的化するsgRNAを手動で設計した(表1)。sgRNA発現プラスミドを生成するために、オリゴヌクレオチドをアニーリングしてsgRNAプロトスペーサーを作製し、二本鎖を、Bbs I消化MA128プラスミド(M.Amendola、フランス、ジェネソンより提供)中にライゲーションした。RNA媒介性塩基編集のために、本発明者らは、最初の3つの5'及び3'ヌクレオチドで2'-O-メチル類似体及び3'-ホスホロチオエート非加水分解性結合を持つ、化学的に修飾された合成sgRNAを使用した(Synthego)。

【表2】

表1. gRNA標的配列。

gRNA	標的配列(5'から3')	位置(hg19)	鎖
ATF4_bs_1	CATGCATCATCCTGGTACC (配列番号19)	chr2: 60725617-60725636	+
ATF4_bs_2	GCATCATCCTGGTACCAGGA (配列番号20)	chr2: 60725621-60725640	+
ATF4_bs_3	CTCCAAGCATTGCATCATCC (配列番号21)	chr2: 60725610-60725629	+

【0107】

mRNAのインビトロ転写

塩基エディターを発現する10 µgのプラスミドを、ポリAテールの直後を1回切断する20ユニットの制限酵素を用いて一晚消化した。線状化プラスミドを、PCR精製キット(QIAGEN #28106)を使用して精製し、30 µlのDNase/RNaseフリー水中で溶出した。1 µgの線状化プラスミドをインビトロ転写反応のためのテンプレートとして使用した(MEGAscript, Ambion #AM1334)。インビトロ転写プロトコールは、以下のように改変された。GTPヌクレオチド溶液は、7.5 mMの代わりに3.0 mMの最終濃度で使用し、アンチリバースキャップ類似体N7-メチル-3'-O-メチル-グアノシン-5'-三リン酸-5'-グアノシン(ARCA, Trilink #N-7003)を最終濃度12.0 mMで使用し、mRNAの効率的なキャッピングを可能にする、キャップ:GTPの最終比率4:1をもたらした。インビトロ反応のためのインキュベーション時間は、30分に低下させた。プラスミド(ABE8e)中でのポリAテールの欠如を伴わない構築物については、ポリアデニル化の追加工程を、製造業者のガイドライン(ポリAテーリングキット, Ambion)を使用して実施した。mRNAを、塩化リチウムを使用して沈殿させ、>1 µg/µlの濃度を達成することを可能にする最終体積においてTE緩衝液中に再懸濁させた。mRNAの質は、Bioanalyzer(Agilent)を使用してチェックされた。

【0108】

RNAトランスフェクション

条件当たり 2×10^5 個のCD34+ HSPCを、mRNAをコードする3.0 µgの酵素、及び最終濃度2.3 µMの合成sgRNAでそれぞれトランスフェクトした。本発明者らは、P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S(Lonza)及びCA137プログラム(Nucleofector 4D)を使用した。非トランスフェクト細胞、又はTE緩衝液を用いて、もしくは酵素をコードするmRNAだけを用いて、又は酵素をコードするmRNA及びAAVS1遺伝子座を標的化するsgRNAを用いてトランスフェクトされた細胞は、ネガティブコントロールとしての役割を果たした。

【0109】

リボ核タンパク質(RNP)トランスフェクション

RNP複合体は、90 µM Cas9-GFPタンパク質及び180 µM合成sgRNA(Cas9:sgRNA比率1:2)を使用して室温で組み立てられた。CD34+ HSPC(2×10^5 個細胞/条件)は、トランスフェクションエンハンサー(IDT)の存在において、P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S(Lonza)及びCA137プログラム(Nucleofector 4D)を使用して、RNP複合体を用いてトランスフェクトされた。非トランスフェクト細胞、又はTE緩衝液を用いて、もしくは酵素をコードするmRNAだけを用いて、又は酵素をコードするmRNA及びAAVS1遺伝子座を標的化するsgRNAを用いてトランスフェクトされた細胞は、ネガティブコントロールとしての役割を果たした。

【0110】

HSPC分化

トランスフェクトCD34+ HSPCは、以前に記載されているように(Giarratana et al., 2005; Weber et al., 2020)、三相赤血球分化プロトコールを使用して成熟RBCに分化させた。第1段階(0日目から6日目)の間に、細胞を、100 ng/ml 組換えヒトSCF(PeproTech)、5 ng/ml 組換えヒトIL-3(PeproTech)、3 IU/ml EPO Eprex(Janssen-Cilag)、及び 10^{-6} Mヒドロコルチゾン(Sigma)が添加された基礎赤血球培地中で培養した。第2段階(6日目から9日目)の間に、細胞を、3 IU/ml EPO Eprex(Janssen-Cilag)が添加された基礎赤血球培地中でMS-5間質細胞と共培養した。第3段階(9日目から20日目)の間に、細胞を、サイトカインを含まない赤血球系基礎培地中で間質MS-5細胞と共培養した。赤血球分化は、CD36、CD71、GYPA、BAND3、及び4-インテグリン赤血球表面マーカーの、ならびにDRAQ5二本鎖DNA色素を使用した除核細胞のフローサイトメトリック分析によりモニタリングされた。7AADを使用して生細胞を同定した。

【0111】

コロニー形成細胞 (CFC) アッセイ

C D 3 4 + H S P C を、赤血球及び顆粒単球の分化を支持する条件下で、メチルセルロースベースの培地 (G F H 4 4 3 5、Stem Cell Technologies) 中に 1×10^3 個細胞/mLの濃度で播種した。B F U - E 及び C F U - G M コロニーを14日後に計数した。コロニーを無作為に選び、バルク集団 (少なくとも25のコロニーを含む) として収集し、塩基編集効率、R T - q P C R 及び R P - H P L C によるグロビン発現、ならびに C E - H P L C によるヘモグロビン発現を評価した。B F U - E を無作為に選び、単一コロニーとして収集し、塩基編集効率及び R T - q P C R によるグロビン発現を評価した。

【0112】

編集効率の評価

塩基編集効率及び I n D e l 頻度を、分化の第1段階の終了時での H S P C 由来赤血球細胞において、ならびに播種後14日の B F U - E 及び C F U - G M において評価した。ゲノムDNAを、製造業者の指示に従い、PURE LINK Genomic DNA Mini kit (Life Technologies) 又は Quick-DNA/RNA Miniprep (ZYMO Research) を使用して、コントロール細胞及び編集細胞から抽出した。s g R N A 標的部位での塩基編集効率を評価するために、本発明者らは、P C R、それに続くサンガー配列決定及び E d i t R 分析を実施した (Kluesner et al., 2018)。T I D E 分析 (分解による I n D e l の追跡) がまた、編集されたサンプル中での I n D e l のパーセンテージを評価するために実施された (Brinkman et al., 2014)。

【表3】

表2. 塩基編集及び InDels 事象を検出するために使用されるプライマー。

増幅領域	F/R	配列(5'から3')
+55-kb 領域	F	CCCTATCAGTGCCGACCAAG (配列番号22)
	R	GTGAGTAGGTAGAGGGGTCAGA (配列番号23)

F、フォワードプライマー。R、リバースプライマー。

【0113】

R T - q P C R

全RNAを、RNeasy micro kit (QIAGEN) を使用して、赤血球系統に分化した S C D H S P C から (13日目)、及び Quick-DNA/RNA Miniprep (ZYMO Research) を使用して、B F U - E プールから抽出した。RNAを、製造業者の指示に従って、DNase I キット (Invitrogen) を使用して、D N a s e を用いて処理した。成熟転写物を、オリゴ (d T) プライマーを用いて、R T - q P C R 用の SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を使用して逆転写した。R T - q P C R を、iTaqユニバーサルSYBR Greenマスターミックス (Biorad) 及び Viia7 Real-Time PCR システム (ThermoFisher Scientific)、又は CFX384 TouchリアルタイムPCR 検出システム (Biorad) を使用して実施した。

10

20

30

40

50

【表 4】

表3. RT-qPCRのために使用されたプライマー。

増幅領域	F/R	配列(5'から3')
HBA	F	CGGTCAACTTCAAGCTCCTAA (配列番号24)
	R	ACAGAAGCCAGGAACTTGTC (配列番号25)
HBB	F	GCAAGGTGAACGTGGATGAAGT (配列番号26)
	R	TAACAGCATCAGGAGTGGACAGA (配列番号27)
HBG1+HBG2	F	CCTGTCCTCTGCCTCTGCC (配列番号28)
	R	GGATTGCCAAAACGGTCAC (配列番号29)

F、フォワードプライマー；R、リバースプライマー

10

【0114】

フローサイトメトリー分析

HSPC由来赤血球細胞を、0.05%冷グルタルアルデヒドを用いて固定し、0.1% TRITON X-100を用いて透過処理した。固定及び透過処理後、細胞を、GYPA赤血球表面マーカーを認識する抗体（PE-Cy7複合体化抗GYPA抗体、563666、BD Pharmingen）及びHbFを認識する抗体（FITC複合体化抗HbF抗体、クローン2D12 552829 BD）、又はHbSを認識する抗体（抗HbS抗体、H04181601、BioMedomics）のいずれかを用いて染色し、ウサギIgGを認識する二次抗体（BV421複合体化抗ウサギIgG、565014、BD）を用いた染色が続いた。CD36、CD71、GYPA、BAND3、及び4-インテグリン赤血球表面マーカーのフローサイトメトリー分析を、V450複合体化抗CD36抗体（561535、BD Horizon）、FITC複合体化抗CD71抗体（555536、BD Pharmingen）、PE-Cy7複合体化抗GYPA抗体（563666、BD Pharmingen）、PE複合体化抗BAND3抗体（9439、IBGRL）、及びAPC複合体化抗CD49d抗体（559881、BD）を使用して実施した。除核細胞又は生存細胞のフローサイトメトリー分析を、二本鎖DNA色素（それぞれDRAQ5、65-0880-96、Invitrogen及び7AAD、559925、BD）を使用して実施した。フローサイトメトリー分析を、Fortessa X20（BD Biosciences）又はGallios（Beckman Coulter）フローサイトメーターを使用して実施した。データを、FlowJo（BD Biosciences）ソフトウェアを使用して分析した。

20

30

【0115】

グロビン鎖のRP-HPLC分析

RP-HPLC分析を、NexeraX2 SIL-30ACクロマトグラフ及びLC Solutionソフトウェア（Shimadzu）を使用して実施した。250×4.6mm、3.6µmのAeris Widedporeカラム（Phenomenex）を使用して、HPLCによりグロビン鎖を分離した。サンプルを、溶液A（水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸、95:5:0.1）及び溶液B（水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸、5:95:0.1）の勾配混合物を用いて溶出した。吸光度を220nmで測定した。

40

【0116】

ヘモグロビン四量体のCE-HPLC分析

陽イオン交換HPLC分析を、NexeraX2 SIL-30ACクロマトグラフ及びLC Solutionソフトウェア（Shimadzu）を使用して実施した。2陽イオン交換カラム（PolyCAT A、PolyLC、メリーランド州コロニア）を使用して、HPLCによりヘモグロビン四量体を分離した。サンプルを、溶液A（20mMピストリス、2mM KCN、pH=6.5）及び溶液B（20mMピストリス、2mM KCN、250mM NaCl、pH=6.8）の勾配混合物を用いて溶出した。吸光度を415nmで測定した。

【0117】

50

鎌状化アッセイ

赤血球分化の終了時に得られた H S P C 由来成熟 R B C を、段階的な低酸素条件下 (2 0 分間にわたり 2 0 % O₂ ; 2 0 分間にわたり 1 0 % O₂ ; 2 0 分間にわたり 5 % O₂ ; 6 0 ~ 8 0 分間にわたり 0 % O₂) でインキュベートし、鎌状化の経時的分析をビデオ顕微鏡によりリアルタイムにおいて実施した。画像を、AxioObserver Z1顕微鏡 (Zeiss) 及び 4 0 × 対物レンズを使用して 2 0 分毎に取得した。時間経過全体を通じて、画像を取得し、次にImageJを用いて処理し、全 R B C 集団における取得の視野当たりの非鎌状赤血球のパーセンテージを決定した。4 0 0 を上回る細胞を、条件当たりでカウントした。

【 0 1 1 8 】

10

結果

S C D H S P C における R N A 媒介性塩基編集は、赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサーの + 5 5 k b 領域を破壊する

B C L 1 1 A 赤血球エンハンサーを破壊するために、本発明者らは、+ 5 5 k b 領域中の A T F 4 B S を標的化した (図 1) 。本発明者らは、C B E - S p R Y 及び A B E - S p R Y 酵素を主に利用したが、それらの P A M レスの性質を考慮しており、それによって、A T F 4 B S の異なる鎖及び位置内に塩基編集ウィンドウを配置することにより s g R N A を設計することを可能にし、このように、異なる種類の変換が可能になる (図 1) 。初代 H S P C において塩基編集システムを導入し、最小限の毒性と併せた高い編集効率を達成するための臨床的に関連する方法を確立するために、本発明者らは、塩基エディターをコードする m R N A 及び合成修飾 s g R N A のトランスフェクションに基づくプロトコルを最適化した。最初に、本発明者らは、C B E - S p R Y 及び A B E - S p R Y をコードするプラスミドをインビトロ転写及び m R N A 産生用に最適化した。特に、本発明者らは、H B B 遺伝子の 3 ' 非翻訳領域 (U T R) の 2 つのコピー (それらは、m R N A の半減期を増加させ、タンパク質レベルを改善することが示されている (Ross and Sullivan, 1985 ; Kariko et al., 1999 ; Holtkamp et al., 2006)) ならびに C B E - S p R Y 及び A B E - S p R Y 構築物 (配列番号 3 0 及び配列番号 3 1) において m R N A をさらに安定化するための 3 ' U T R 後のポリ A 配列 (Gallie, 1991) を挿入した。最適化されたプラスミド C B E - S p R Y - O P T 及び A B E - S p R Y - O P T を、インビトロ転写及び m R N A 産生用に使用した。

20

30

40

50

【化 2 3】

配列番号30>CBE-SpRYをコードするmRNA配列。mRNAの異なる領域が、以下のとおりに示されている：
Kozak配列-CBE-SpRYコード配列-HBB3'UTR(1番目のコピー)-HBB3'UTR(2番目のコピー)-
ポリAテール-残りのヌクレオチド(制限酵素部位まで)

GGGAGAGCCGCCACCAUGAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGUUCGAGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGAGC
AGCGAGACCGGCCCCGUGGCGCGUGGACCCACCCUGCGGGCGGGAUCGAGCCCCACGAGUUCGAGGUGUUCUUC
GACCCCCGGGAGCUGCGGAAGGAGACCUCCUGCUGUACGAGAUCAACUGGGGCGGCCGCACAGCAUCUGGCGG
CACACCAGCCAGAACACCAACAGCACGUGGAGGUGAACUUCGAGAGAAGUUCACCACCGAGCGGUACUUCUGC
CCCAACACCCGGUGCAGCAUCACCUGGUUCCUGAGCUGGAGCCCCUGCGGGCAGUGCAGCCGGGCCAUCACCGAG
UUCUGAGCCGGUACCCCCACGUGACCCUGUUAUCUAUCGCCCCGGCUGUACCACCACGCGCCACCCCGGAAC
CGGCAGGGCCUGCGGGACCUGAUCAGCAGCGGGCUGACCAUCCAGAUCAUGACCAGCAGGAGAGCGGCUACUGC
UGGCGGAACUUCGUGAACUACAGCCCCAGCAACGAGGCCACUGGCCCGGUACCCCCACCUUGUGGGUGCGGCUG
UACGUGCUGGAGCUGUACUGCAUACUCCUGGGCCUGCCCCUGCCUGAACAUCCUGCGGGCGGAAGCAGCCCCAG
CUGACCUUCUUCACCACUCCGCGCAGAGCUGCCACUACCAGCGGCUGCCCCCACAUCCUGUGGGCCACCGGC
CUGAAGAGCGGGCAGCAGCGGGCAGCAGCGGCAGCGAGACCCCGGCACCAGCGAGAGCGCCACCCCGAG
AGCAGCGGGCAGCAGCGGGCAGCGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGGCCAUCGGCACCAACAGCGUGGGC
UGGGCCUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCAGCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACAGC
AUCAAGAAGAACUGAUCGGCGCCUGCUGUUCGACAGCGGGGAGACCGCGAGCGGACCCGGCUGAAGCGGACC
GCCCGCGGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUUCUGCUACCUGCAGGAGAUUCUACGCAACGAGAUGGCCAAG
GUGGACGACAGCUUCUCCACCGGCUGGAGGAGAGCUUCUGGUGGAGGAGACAAGAAGCAGCAGCGGCACCCC
AUCUUCGGCAACAUCCUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCACCUCCUGGGAAGAAGCUG
GUGGACAGCACCGCAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCUGGCCACAUGAUCAAGUUCGGGGCCAC
UUCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACAGCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUAC
AACCAGCUGUUCGAGGAGAACCACAACGCCAGCCAGCGGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGAGCGCCCGCUGAGC
AAGAGCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGACGGCCUGUUCGGCAACUGAUC
GCCUGAGCCUGGGCCUGACCCCAACUUCAGAGCAACUUCGACCUGGGCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGAGC
AAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCGGCCAGAUCCGGCGACCAGUACCGCGACCUGUCCUGGCC
GCCAAGAACCUGAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCUCCGGGUGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCCCUG
AGCGCCAGGAGAUCAAGCGGUACGACGACCACGAGCUGACCCUGCUGAAGGCCUCCUGGUGCGGCCAGCAG
CUGCCCAGAGAAGUACAAGGAGAUUCUUCGACCAGAGCAAGAAGCGGCUACGCCGGCUAUCGACGGCGGCC
AGCCAGGAGGAGUUCACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAG
CUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAAACGGCAGCAUCCCCACCAGAUCCACCGGGC
GAGCUGCAGCCAUCCUGCGCGGCAGGAGGACUUCUACCCUUCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCAAGGAG
AUCCUGACCUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGCAACAGCCGCUUCGCGUGAUGACCCGG
AAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGGAACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCUUCAC
GAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUAC
UUCACCUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUGAGCGGC
GAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGAC
UACUUCAGAAGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAUACGGCGGUGGAGGACCGGUUCAACGCCAGCCUGGGC
ACCUACCAGCACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCUGGAG
GACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUG
UUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGGCGGGUACACCGGCUGGGCCGGCUGAGCCGGAAGCUGAUC
AACGGCAUCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGCUUCGCCAACGGAAC
UUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACGACCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCAGAAAGGCCAGGUGAGCGGCCAGGGC
GACAGCCUGCACGACACAUCGCCAACCCUGGCCGGCAGCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAG
GUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCGGGAGAAC
CAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGC
AGCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACCACAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGUACUACCUGCAG
AACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUAACCGGCUGAGCGACUACGACGUGGACCACAUCGUG
CCCCAGCUCUUCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUGUGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGCAAGAGC
GACAACGUGCCCAGCGAGGAGGUGGUGAAGAAGUAAGAACUACUGGGCGCAGCUGCUAAGCCAAAGCUGAUC
ACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUAGACCAAGGCCGAGCGGGCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUC
AAGCGGACGUGGUGGAGACCCGGCAGUACCAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACAGCCGGAUGAACACCAAG
UACGACGAGAAGCAAGCUGAUCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACUUCGG
AAGGACUCCAGUUCACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCACGACCCUACCUAGACCGCGUG

10

20

30

40

50

GUGGGCACCGCCUGAUC AAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGAC
GUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAU CGGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCACAGCAACAUC
AUGAACUUCUUC AAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGC
GAGACCGGGCAGAUUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGAGCAUGCCCCAGGUG
AACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGGCGGUUCAGCAAGGAGAGCAUCCGGCCCAAGCGGAACAGCGAC
AAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGUUCCUGUGGCCACCGUGGCCUACAGC
GUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACC
AUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAGAAGAACC CAUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAG
GACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUCUGGCCAGCGCC
AAGCAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUGCCAGCAAGUACGUGAACUUCUGUACCUUGGCCAGCCUAC
GAGAAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACCAAGCACUACCUGGAC
GAGAUCAUCGAGCAGAUACAGCGAGUUCAGCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUUGGACAAGGUGCUGAGC
GCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCCGG
CUGGGCGCCCCCGGGCCUUC AAGUACUUCGACACCACCAUCGACCCCAAGCAGUACCGGAGCACCAAGGAGGUG
CUGGACGCCACCCUGAUCCACCAGAGCAUACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGAGCCAGCUGGGCGGC
GACAGCGGGCGCAGCGGGCGCAGCGGGCGCAGCACAACCUAGAGCGACAUCAUCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAG
CUGGUGAUCCAGGAGAGCAUCCUGAUGCUGCCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUCCGGCAACAAGCCCGAGAGCGAC
AUCCUGGUGCACACCGCCUACGACGAGAGCACCGACGAGAACGUGAUGCUGCUGACCAGCGACGCCCCCGAGUAC
AAGCCCUGGGCCUGGUGAUCCAGGACAGCAACGGCGAGAACAAGAUAAGAUGCUGAGCGGGCGCAGCGGGCGGC
AGCGGGCGCAGCACCAACCUAGAGCGACAUCAUCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAGCUGGUGAUCCAGGAGAGCAUC
CUGAUGCUGCCCGAGGAGGUGGAGGAGGUGAUCCGGCAACAAGCCCGAGAGCGACAUCCUGGUGCACACCGCCUAC
GACGAGAGCACCGACGAGAACGUGAUGCUGCUGACCAGCGACGCCCCCGAGUACAAGCCCUUGGGCCUGGUGAUCC
CAGGACAGCAACGGCGAGAACAAGAUCAAGAUGCUGAGCGGGCGGCAGCAAGCGGACCGCCGACGGCAGCGAGUUC
GAGCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGGCGGGCGGCAGCGGGCCACCAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCCGGC
GACGUGGAGGAGAACC CGGCCCAUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUCACCGGGCUGGUGCCCAUCCUGGUG
GAGCUGGACGGCGACGUGAACGGCCACAAGUUCAGCGUGAGCGGGCGAGGGCGAGGGCGACGCCACCUACGGCAAG
CUGACCCUGAAGUUCAUUCGACACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCUGGCCACCCUGGUGACCACCCUGACCUAC
GGCUGCAGUGCUUCAGCCGGUACCCCGACCACAUGAAGCAGCAGCAGCUUCUUC AAGAGCGCCAUCCCGAGGGC
UACGUGCAGGAGCGGACCAUCUUCUUC AAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGGGCCGAGGUGAAGUUCGAGGGC
GACACCCUGGUGAACCGGAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUC AAGGAGACGGCAACAUCUGGGCCACAAGCUG
GAGUACAACUACAACAGCCACAACGUGUACAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAACUUCAAG
AUCCGGCACAAUCGAGGACGGCAGCGUGCAGCUGGCCGACCACUACCAGCAGAACACCCCAUCGGCGACGGC
CCCGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUGAGCACCCAGAGCGCCUGAGCAAGGACCCCAACGAGAAGCGGGAC
CACAUGGUGCUGCUGGAGUUCGUGACC CGCCCGGCAUCACCCUGGGCAUGGACGAGCUGUACAAGUGA
AGCUCGCUUCUUCUGCUGUCCA AUUUUCUAUUAAAAGGUUCCUUGUUCUUAAGUCCAACUACUAAAACUGGGGGAUA
UUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUUAUUUUCAUUGCUGCGCUAGAAGCUCGCU
UUCUUGCUGUCCA AUUUUCUAUUAAAAGGUUCCUUGUUCUUAAGUCCAACUACUAAAACUGGGGGAUAUUUAUGAAG
GGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUUAUUUUCAUUGCUGCGGGACA UUCUUAUUAAAAAAA
AA
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCUUAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG
CUUUUUUUCUAGA

10

20

30

40

50

【化 2 4】

配列番号31> ABE-SpRYをコードするmRNA配列。mRNAの異なる領域が、以下のとおりに示されている：
T7プロモーター-ABE-SpRYコード配列-HBB3'UTR(1番目のコピー)-HBB3'UTR(2番目のコピー)-
ポリAテール-残りのヌクレオチド(制限酵素部位まで)

GGGAGAGCCGCCACCAUGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGUUCGAGUCACCAAAGAAGAAGCGGAAAGUCUCU
GAAGUCGAGUUUAGCCACGAGUAUUGGAUGAGGCACGCACUGACCCUGGCAAAGCGAGCAUGGGAUGAAAGAGAA
GUCCCCGUGGGCGCCGUGCUGGUGCACAACAAUAGAGUGAUCGGAGAGGGAUGGAACAGGCCAAUCGGCCGCCAC
GACCCUACCGCACAGCAGAGAUCAUGGCACUGAGGCAGGGAGGCCUGGUCAUGCAGAAUUACCGCCUGAUCGAU
GCCACCCUGUAUGUGACACUGGAGCCAUGCUGAUGUGCGCAGGAGCAAUGAUCCACAGCAGGAUCGGAAGAGUG
GUGUUCGGAGCACGGGACGCCAAGACCGGCGCAGCAGGCUCCUGAUGGAUGUGCUGCACCACCCCGGCAUGAAC
CACCGGGUGGAGAUACAGAGGGAAUCCUGGCAGACGAGUGCGCCGCCUGCUGAGCGAUUUCUUUAGAAUGCGG
AGACAGGAGAUCAAGGCCCAGAAGAAGGCACAGAGCUCCACCGACUCUGGAGGAUCUAGCGGAGGAUCCUCUGGA
AGCGAGACACCAGGCACAAGCGAGUCCGCCACACCAGAGAGCUCCGGCGGCUCUCCGGAGGAUCCUCUGAGGUG
GAGUUUCCCACGAGUACUGGAUGAGACAUGCCCUGACCCUGGCCAAGAGGGGCACGCGAUGAGAGGGAGGUGCCU
GUGGGAGCCGUGCUGGUGCUGAACAAUAGAGUGAUCGGCGAGGGCUGGAACAGAGCCAUCGGCCUGCAGACCCA
ACAGCCCAUGCCGAAAUUAGGCCCUAGAGACAGGGCGGCCUGGUCAUGCAGAACUACAGACUGAUUGACGCCACC
CUGUACGUGACAUUCGAGCCUUGCGUGAUGUGCGCCGGCGCCAUGAUCCACUCUAGGAUCGGCCGCGUGGUGUUU

10

20

30

40

50

GGCGUGAGGAACGCAAAAACCGGCGCCGAGGCUCCUGAUGGACGUGCUGCACUACCCCGGCAUGAAUACCCGCG
 GUCGAAAUAUACCGAGGAAUCCUGGCAGAUAAUGUCCGCCUUGCUGUUCUUAUUUCGGAUGCCUAGACAG
 GUGUUCAAUGCUCAGAAGAAGGCCAGAGCUCCACCGACUCCGGAGGAUCUAGCGGAGGCUCCUCUGGCUCUGAG
 ACACCGUGGCACAAGCGAGAGCGCAACACCCUGAAAGCAGCGGGGGCAGCAGCGGGGGGUCAGACAAGAAGUACAGC
 AUCGGCCUGGCCAUCCGCAACUCUGUGGGCUGGGCCUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCAGCAAGAAA
 UUCGAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAACCCUGAUCGAGCCUGCUGUUCGACAGCGGC
 GAAACAGCCGAGAGAACCCGGCUGAAGAGAACCCGCAAGAGAUACACCGACGGAAGAACCGGAUCUGCUAU
 CUGCAAGAGAUUCAGCAACGAGAUUGGCCAAGGUGGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAGUCCUCCUG
 UUGGAAGAGGAUAAGAAGCAGGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCCAGGAAAG
 UACCCACCAUCUAACCCUGGAGAAAGAAACUGGUGGACAGCACCGACAAGGCCGACCGCGGCUGAUCUAUCUG
 GCCUGGCCCAUGAUCUAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAGGGCCGACCGAACCACAGCGAGCGUG
 GACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACAGCUGUUCGAGGAAAACCCCAUCAACGCCAGCGGCGUG
 GACGCCAAGGCCAUCCUGUCUGCCAGACUGAGCAAGAGCAGCGGCUUGGAAAUCUGAUCGCCAGCUGCCCGC
 GAGAAGAAGAUUGGCCUGUUCGGAAAACCCUGAUGCCUGAGCCUGGGCCUGACCCCAACUUAAGCAACUUC
 GACCGGCCGAGGAUGCCAAACUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACCGACCGGACAACCCUGCGGCCAG
 AUCGGCGACAGUACGCCGACCGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCUG
 AGAGUGAACCCGAGAUACCAAGGCCCCCGAGGCGCCUCUAUGAUCAGAGAUACGACGAGCACCACCGAGC
 CUGACCCUGCUGAACCGGCGGAGCCAGCAGCUGAAGAUACAAGAGAUUUUCUUCGAGCAGAGCAAG
 AACGGCUACGCCGGUACAUUGAGCGGCGAGCCAGCCAGGAAGAUUCUAAGUUCUAACGCCCAUCUGGAA
 AAGAUGGACGGCAGGAAACUGCUGGAGCUGAAGCAGAGAGGACCGUCUGCGGAGCAGCGGACCUUCGAC
 AACGGCAGCAUCCCCACAGAUACCCUGGGAGAGCUGCAGCCAUUCUGCGGGCGGAGGAAGAUUUUACCCA
 UUCUGAAGGACAACCGGGAAAAGAUCCGAGAAGAUCCGACCUUCGCAUCCCUACUGGUGGGCCUCUGGC
 AGGGAAAACAGCAUUCGCGGGAUGACCAAGAAAGCGGAGAAACCAUCACCCCGGAAUCUGGAGGAAGUG
 GUGGACAAGGGCGCUCCGCCAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGAUAAGAACCGCCCAAGGAAAG
 GUGUGCCCAAGCAGCCUGCUGUACGAGUACUACCCGUGUAUAACGAGCUGACCAAGUAAAUAUCGUGACC
 GAGGAAUGAGAAAGCCCGCUUCUGAGCGGCGAGCAGAAAAGGCCAUCGUGGACCGUCUGUUAAGACCAAC
 CGGAAAACAGCCGUAAGAGCGGAGAGCAUCUUAAGAAAUCGAGUGCUUCGACUCCGGAUUCGAGGAAGUG
 GGGUGGAAAGAUCCGUUAACCGCCUCCUGGGCACAUACCAGAUUCGUGAUAUUUAAGGACAAGGACUUC
 CUGGACAAUGAGGAAAACGAGGACAUUCUGGAAAUUCGUGCUGACCCUGACACUUGUAGGACAGAGAGAU
 AUCGAGGAACCGGCUAAAACCUAUGCCACCGUUCGACGACAAGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGAGAUAC
 ACCGGCUGGGGCGAGCUGGCGGAGCUGAUAACCGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGCAAUCCUGGAU
 UUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACAGAAACUUCAGCAGCUGAUCACGACGACGACCGUACCUUAAAGAG
 GACAUCCAGAAAGCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGAUAGCCUGCAGCAGCACAUCGCAUUCGCGGCGGAGCC
 GCCAUUAAGAAGGGCAUCCUGCAGACAGUGAAGGUGGAGCAGCUGCUGAAGUGAUGGGCCGGCACAAGGCC
 GAAACAUUCGUGAAGAAUGGCCGAGAGAGAACCGACCCAGGAGGAGCAGAAAGAACAGCGCGGAGAAUG
 AAGCGGAUCGAAGAGGGCAUCAAGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGAAACACCCCGUGGAAAACACCCAGCUG
 CAGAACGAGAGCUGUACCGUACUACCGCAGAAUGGGCGGGAUUGUACGUGGACGAGGAACUGGACAUAAC
 CGGCUUGCCAGUAUGGACCAUAUCGUGCCUCAGAGCUUCUGAAGGACGACUCCAUCCGACAACAAGGUG
 CUGACCCAGAAAGCAGAAAGCCGAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
 UACUGGGCGGACGUCUGAAGCCAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUCGACAAUCUGACCAAGGCCGAGAGAGGC
 GGCCUGAGCGAACUGGAUAAGGCCGGCUUCAAGAGACAGCUGGUGGAAACCCGGCAGAUACAAAGCAGCUG
 GCACAGAUCCUGGACUCCCGAUGAACACUAAGUACGACGAAUGACAAGCUGAUCGGGAAAGUGAAAGUGAUC
 ACCUGAAGCCAGCUGGAGCUGGAGUUCGGAUUUCGGAUUUCAGUUAUACAAAGUGCGCGAGAUACAACAUAC
 CACCAGCCACGACGCUACCGUACGCGGUCGUGGGAACCGCCUGAUCAAAAGUACCCUAAGCUGGAAAGC
 GAGUUCGUGUACGGGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUAGCAGCAGAGCAGGAAAUCCGGCAAG
 GCUACCGCCAAAGUACUUCUUCACAGCAACAUCAGAACUUUUAAGACCCGAGAUUACCCUGGCCAACGGCGAG
 AUCCGGAAGCGGCCUCUGAUCGAGACAACGGCGAAACCGGGGAGAUCCUGUGGGAUAAGGGCCGGGAUUUUGCC
 ACCGUGCGGAAAGUGCUGAGCAUGCCCAAGUGAAUUCGGAUUAUCGAAAAGACCCGAGGUGCAGACAGCGGCUACG
 AAAGAGUCUAUCAGACCCAAGAGGAACAGCGAUAAAGCUGAUCGCCAGAAAGAGGACUGGGACCCUAAGAAGUAC
 GCGCGCUUCUGUGGCCACCGUGGCCUAUUCUGUGCUGGUGGUGCCAAAGUGGAAAGGGCAAGUCCAAAGAAA
 CUGAAGAGUGAAGAGCUGCUGGGGAUCACCAUCAGGAAAGAGCAGCUCGAGAAAGAUCCCAUCGACUUU
 CUGGAAGCCAGGGCUACAAGAAAGUGAAAAGGACCGAUCUAACAGCUGCCUAAGUACUCCUUCGAGGCU
 GAAAACGGCCGGAAGAAUGCUGGCCUCUGCCAAGCAGCUGCAGAAAGGAAACGAAUCGGCCUGCCUCCAAA
 UAUGUGAACUUCUGUACCGGCCAGCCACUAUGAAGAGCUGAAGGGCUCGCCGAGGAUAUAGAGCAAGAACAG
 CUGUUUGGAAACAGCACAAGCACAUCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUACGCGAGUUCUCCAGAGAGUGAUC
 CUGGCCAGCUGUAUCUGGACAAAGUGCUGUCCCGCUACAACAAGCAGCCGGAUAAGCCCAUCAGAGAGCAGGCC
 GAGAAUAUCAUCCACCGUUAUCCUGACCGAGCUGGGAGCCCUAGAGCCUUAAGUACUUCAGACCAACUUC
 GACCCCAAGCAGUACAGAAGCACAAGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCACCAGAGCAUCACCGGCCUGUAC
 GAGACCGGAUCGACCGUCUCAGCUGGGAGGUGACUCUGGGCCUCAAAAAGAACCGCCAGCGGAGCGAAUUC
 GAGCCCAAGAAAGAGGAAAGCUGGAAAGCGGAGCUACAACUUCAGCCUGCUGAAGCAGGCGUGGAGCGUGGAG
 GAGAACCCUGGACCUAUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUACACCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUCGAGCUGGAC

10

20

30

40

50

GGCGACGUAAACGGCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUG
AAGUUCAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCCGUGGCCACCCUCUGACCACCCUGACCUAUGGAGUGCAG
UGCUCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCAGCAGCUUCUUAAGUCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUCCAG
GAGCGCACCAUCUUCUUAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUCGAGGGCGACACCCUG
GUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCUGGGGCACAAGCUGGAGUACAAC
UACAACGAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGGUGAAGCUCAAGAUCGCGCAC
AACAUCGAGCCAGCGCAGCUGCAGCUGCCGACCACUACCAGCAGAACACCCCAUCGGGCAGCGGCCCGUGCUG
CUGCCCGACAACCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCCCGUGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUC
CUGCUGGAGUUCGUGACCGCCCGCGGAUACUCUCGCGCAUGGACGAGCUGUACAAGUCUGGUGGUUCUCCCAAG
AAGAAGAGGAAAGUCUAA GCUAGAAGCUCGCUUUUCUUGCUGUCCAUUUUUAUUAAAAGGUUCCUUUGUUCUUAA
GUCCAACUACUAAACUGGGGGAUUUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUUAUUU
UCAUUGCUGCGCUAGAAGCUCGCUUUUCUUGCUGUCCAUUUUUAUUAAAAGGUUCCUUUGUUCUUAAAGUCCAACU
ACUAAACUGGGGGAUUUUAUGAAGGGCCUUGAGCAUCUGGAUUCUGCCUAAUAAAAACAUUUUAUUUUCAUUGCU
GCGGGACAUUCUUAUUAAA
AAA
AAAGGGCUUAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU
UGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUCUAGA

10

20

30

40

50

【 0 1 1 9 】

インビトロ転写された C B E - S p R Y - O P T 又は A B E - S p R Y - O P T m R N A を、化学修飾 s g R N A との組み合わせにおいて S C D H S P C (3 つの非動員ドナー) 中にトランスフェクトした (図 2 A) 。トランスフェクト S C D H S P C は、赤血球系統に向かって分化された (図 2 A) 。 A T F 4 _ b s _ 1 又は A T F 4 _ b s _ 2 s g R N A と併せた C B E - S p R Y は、 4 7 . 0 % ± 7 . 0 [平均値 ± 平均値の標準誤差 (S E M)] 及び 4 6 . 7 % ± 3 . 8 の効率を伴う A T F 4 B S の破壊、ならびに本明細書中で以降、それぞれ T T G T A T T A T T T (配列番号 3 2) 及び T T G C A T T A T T T (配列番号 3 3) の、それぞれ + 5 5 C B E I 又は + 5 5 C B E I I と名付けられた編集プロファイルに導く ; 図 2 B) 。 A T F 4 _ b s _ 1 又は A T F 4 _ b s _ 2 s g R N A と併せた A B E - S p R Y は、 6 3 . 7 % ± 2 . 2 及び 2 4 . 3 % ± 2 . 7 の効率を伴う A T F 4 B S の破壊、ならびに本明細書中で以降、それぞれ (T T G C G T C A T C C (配列番号 3 4) 及び T T G C A T C G T C C (配列番号 3 5) の、それぞれ + 5 5 A B E I 又は + 5 5 A B E I I と名付けられた編集プロファイルに導く ; 図 2 B) 。並行して、塩基編集と C a s 9 ヌクレアーゼ戦略を比較するために、本発明者らは、 C a s 9 ヌクレアーゼ及び A T F 4 _ b s _ 3 s g R N A を含む R N P 複合体をトランスフェクトし (Huang et al., 2020) 、 8 6 . 8 % ± 1 . 6 の効率を伴って、赤血球特異的 B C L 1 1 A エンハンサーの + 5 5 kb 領域中の A T F 4 B S を破壊した (本明細書中で以降、 + 5 5 C a s 9 と名付ける) (図 2 C) 。 T I D E 分析によって、塩基エディターの D S B 不含の性質が確認された。なぜなら、本発明者らは、塩基編集サンプル中で I n D e l を検出しなかったためである (図 2 C) 。結論として、本発明者らは、代替塩基を標的化することにより、 S C D H S P C 中で D S B を起こすことなく、 + 5 5 kb B C L 1 1 A エンハンサー領域で A T F 4 B S を効率的に標的化することができた。

【 0 1 2 0 】

S C D H S P C における B C L 1 1 A エンハンサーの R N A 媒介性塩基編集は、前駆細胞の生存率及び分化に影響を及ぼさず、赤血球系コロニーにおいて H b F を再活性化するトランスフェクト S C D H S P C を C F C アッセイに供した (図 2 A) 。 B F U - E 及び C F U - G M プールコロニーにおける塩基編集効率は、 + 5 5 kb 領域を標的化する s g R N A については、液体赤血球培養中で観察されたものと同様であった一方で、編集効率は、 B F U - E プールと比較して、 C F U - G M においてはより低く、より可変的である傾向があった (図 3 A) 。 I n D e l は、 T I D E 分析により測定されるように、塩基編集サンプル中には存在しなかった (図 3 B 及び C) 。 C a s 9 ヌクレアーゼ処理サンプルでは、 B F U - E 中の I n d e l 効率は、赤血球バルクにおいて観察されたものと同様であり、 C F U - G M 中よりも高かった (図 3 B 及び C) 。 S C D H S P C の R N A

トランスフェクション、又はそれ自体の編集のいずれも、CFCアッセイにより示されるように、赤血球系又は非赤血球系前駆細胞に影響を及ぼさなかった。実際に、有意差は、赤血球系BFU-Eコロニー及び顆粒単球系CFU-GMコロニーの数に関して、コントロールサンプルと塩基編集サンプルの間に観察されなかった(図4D)。これらの結果は、本発明者らの治療戦略が前駆細胞の生存能力ならびに赤血球系及び顆粒単球系に向けた分化に影響を及ぼさないことを実証する。

【0121】

本発明者らの戦略の治療可能性についての最初の洞察は、赤血球特異的BCL11AエンハンサーのRNA媒介性塩基編集時での、赤血球BFU-EプールにおけるHbF再活性化であった。特に、CE-HPLC分析によって、塩基編集サンプルが、コントロール(未処理サンプルにおける22.1%×7.4)と+55 Cas9サンプル(49.7%×2.2)の間の中間のHbFレベルを発現することが示された(図3E)。+55 ABEサンプルと比較して、+55 CBEサンプル中ではより高いHbFレベルの傾向があった(+55 CBE I、II、ABE I及びIIプロファイルについてそれぞれ41.9%±4.6、39.1%±3.1、35.3%±7.1、及び34.5%±10.8)(図3E)。これらの結果は、単一グロビン鎖を検出するRP-HPLCにより確認された(図3F)。全体的には、これらのデータは、+55 kb赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの塩基編集媒介性破壊が、塩基編集SCD HSPCから由来する赤血球系BFU-Eコロニー中のグロビン遺伝子を、修飾の種類に基づいて、変動レベルの発現を伴って再活性化することを示す。

【0122】

赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊によって、塩基編集SCD HSPCから由来するRBC中のHbFが再活性化される

赤血球系BFU-Eコロニーは、高レベルのHbFバックグラウンドを持ち、小さな割合だけの、完全に分化した赤血球細胞を含み、従って、本発明者らが、除核RBCにおけるHbF再活性化という点で最も強力な編集プロファイルを正確に特定することは可能にならない。従って、本発明者らは、完全に分化したコントロール及びトランスフェクトSCD HSPCから由来する成熟RBCにおいて達成されるHbF再活性化を評価した(図2A)。

【0123】

最初に、本発明者らは、これらの治療戦略の安全性を評価するために、赤血球分化過程に対する本発明者らの戦略の効果を評価した。この目的のために、本発明者らは、赤血球分化に沿った除核細胞(DRAQ5細胞)の頻度を測定した。全てのサンプルにおいて、本発明者らは、分化に沿った除核率の増加を観察したが、成熟除核赤血球は、分化の終了時に全細胞の約60%まで達した。重要なことに、除核率における有意な差は、コントロールサンプルと処理サンプルの間で見出されず(図4A)、BCL11A赤血球特異的エンハンサーのRNA媒介性塩基編集が、除核過程に影響を及ぼさないことを示している。SCD HSPC赤血球分化に対する本発明者らの手順の影響をより良く評価するために、本発明者らは、フローサイトメトリーにより赤血球分化に沿った赤血球表面マーカー(CD36、CD71、GPA、BAND3、及び4-インテグリン)の発現を評価した。分化に沿って、コントロールサンプル及び編集サンプルにおいて、GPA及びバンド3を発現する細胞の頻度における同様の増加、ならびにCD36、CD71、及び4-インテグリンを発現する細胞の頻度における同様の減少を観察した(図4B~E)。要約すると、赤血球特異的BCL11AエンハンサーにおいてATF4 BSを標的化することによって、SCD HSPC赤血球分化は損なわれなかった。

【0124】

本発明者らは次に、コントロール及び編集HSPCから由来するRBCにおけるHbF再活性化のレベルを評価した。CE-HPLC分析によって、全てのサンプルにおけるHbF再活性化が明らかになった(図5A)。CBE処理サンプルは、ABE処理サンプル(ABE I及びIIプロファイルについてそれぞれ16.5%±5.0及び15.0

6% ± 4.1)と比較して、より高いHbFレベル(CBE I及びIIプロファイルについてそれぞれ24.5% ± 7.2及び23.6 ± 6.4)を示した(図5A)。注目すべきことに、ABE Iプロファイルを保有する細胞は、高い塩基編集効率にもかかわらず、適度なHbFレベルを示し、標的塩基がATF4結合のために必須ではないことを示唆している。逆に、ABE IIプロファイルを保有する細胞は、低い塩基編集効率にもかかわらずHbFを再活性化し、変換塩基がATF4結合のために重大であることを示している。CBE又はCas9のいずれかを用いたATF4 BSの破壊は、Cas9ヌクレアーゼ処理サンプルにおける編集効率が、塩基編集サンプルより2倍高かったにもかかわらず、同様のレベルのHbF(Cas9処理サンプルについては29.3% ± 6.7)に導いた(図5A)。これらの結果は、mRNA及び単一グロビン鎖レベルでのRT-qPCR及びRP-HPLCにより確認された(図5B及びC)。フローサイトメトリック分析によってこれらのデータが確認され、+55 CBE I、II、及びABE Iサンプルは、F細胞の高い割合を示しており(それぞれ56.9% ± 13.6、55.2% ± 11.9、及び54.0% ± 13.4)、Cas9ヌクレアーゼ処理サンプルにおいて観察された値(62.3% ± 10.3)に近づいた(図5D)。HbS発現細胞の頻度は、しかし、コントロールサンプルと全ての編集サンプルの間で同様であった(図5D)。最後に、鎌状化アッセイをコントロールサンプル及び編集サンプルにおいて実施した。高頻度の修正細胞が、塩基編集サンプルについて観察された(56.1% ± 25.5まで)(図5E)。

10

20

【0125】

全体的に、これらのデータは、+55 kb領域中のATF4 アクチベーターBSの塩基編集媒介性破壊が、HbF再活性化及び寛解された病理学的鎌状化表現型に導くことを示す。興味深いことに、異なる塩基又は塩基の組み合わせは、これらのTFの結合において異なる役割を有し、それらのうちの一部はより重要であり、このように、BCL11Aを下方調節し、HbFを再活性化するための強力な塩基編集標的を表している。

【0126】

単一赤血球前駆細胞におけるHbF再活性化

トランスフェクトSCD HSPCをCFCアッセイに供した(図2A)。種々の編集アプローチの有効性を正確に比較するために、本発明者らは、BFU-Eにおけるクローンレベルでグロビン発現を測定した。本発明者らは、CBE I及びCBE II群の両対立遺伝子編集プロファイルを持つコロニーにおいて有意なグロビンの再活性化を観察した一方で、単一对立遺伝子編集を持つ同じ群のコロニーについては、コントロールと比較して、より高いグロビン発現についての傾向があった(図6A)。興味深いことに、ABE IIプロファイルによって、両対立遺伝子編集を持つコロニーだけでなく、しかし、また、単一对立遺伝子編集を伴うコロニーでも、有意に高いグロビン発現が可能になり、高いHbFレベルを誘導する、単一のA>G変異(ATF4結合部位の位置8における)の能力を強調している(図6A)。逆に、ABE Iプロファイルは、異なるA>G変異(ATF4結合部位の位置6における)を持ち、両対立遺伝子編集を有するコロニーにおいてさえ、いかなる有意なグロビン再活性化も示さなかった(図6A)。同様に、本発明者らは、CBE I、CBE II、及びABE II群における塩基編集効率及びグロビン発現の間に正の相関関係を観察した(図6B)。ABE IIプロファイルの生成は、グロビン再活性化の点で最も強力な事象であった(図6B)。CBE I及びCBE IIプロファイルは、同様のグロビンレベルを示した一方で、ABE Iは、有意なグロビン再活性化を示さなかった(図6B)。全体的に、これらのデータは、赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの+55 kb領域中のATF4転写アクチベーターBSの破壊を通じてHbFを再活性化する異なる編集プロファイルの能力を実証する。

30

40

【0127】

より正確で高度に加工性の塩基エディターを用いた、SCD HSPCにおける赤血球特異的BCL11Aエンハンサーの破壊

50

より効率的かつ正確な方法において最良の性能プロファイル (CBE I 及び ABE I I) を生成するための取り組みにおいて、本発明者らは、NGG PAM を認識する BE 酵素を利用した。これによって、以前の実験において使用されたほぼ PAMless SpRY ベースの酵素と比較して、PAM 認識のおかげで、潜在的なオフターゲット効果が最小限に抑えられる。このフレームでは、本発明者らは、NGG PAM を認識する AncBE4max 酵素を使用した。本発明者らは、最初に、同様に HBB の 3' UTR の 2 コピー及び 3' UTR 後のポリ A 配列を加えることにより、インビトロ転写及び mRNA 産生用に AncBE4max プラスミドを最適化した。最適化されたプラスミド AncBE4max - OPT をインビトロ転写と及び mRNA 産生のために使用した。インビトロ転写された AncBE4max - OPT 又は CBE - SpRY - OPT mRNA を、化学修飾された ATF4__bs__1 sgRNA との組み合わせにおいて SCID HSPC (1 人の非動員ドナー) においてトランスフェクトした (図 2 A)。トランスフェクトされた SCID HSPC を「HSPC 培地」中で培養した。両方の酵素が、同様のレベルの C > T 変換をもたらし、本発明者らが、また、より正確な塩基エディターを用いて CBE I プロファイルを再現できることを実証している (図 7)。

10

【0128】

並行して、本発明者らは、より効率的かつ正確な様式において ABE I I プロファイルを作製するために、NGG 認識 ABE8e 酵素を使用した。本発明者らは、化学修飾された ATF4__bs__2 sgRNA との組み合わせにおける ABE8e mRNA を用いて SCID HSPC (2 人の非動員ドナー) にトランスフェクトした (図 2 A)。トランスフェクト SCID HSPC は、赤血球系列に向けて分化する、又は CFC アッセイに供された (図 2 A)。本発明者らは、赤血球系液体培養物及び BFU-E 又は CFU-GM コロニーの両方において高い塩基変換率を観察した (約 90% まで; 図 8 A)。注目すべきことに、本発明者らは、ABE I I プロファイル (ATF4 結合部位の位置 8 において 1 つの単一 A > G 変異) を正確に作製することはできなかったが、しかし、酵素の高い処理能力のおかげで、ABE I I I と名付けられた新たな編集プロファイルを生成したが、それは、位置 6 及び 8 において 2 つの A > G 変異を持つ (図 8 A)。ABE I I I プロファイルの生成は、ABE8e を使用して得られた高レベルの BE 効率のおかげで、赤血球系 BFU-E コロニーにおける非常に高い HbF と非常に効率的に関連付けられた (図 8 A 及び B)。

20

30

【0129】

注目すべきことに、代替 sgRNA は、ATF4 結合部位の位置 8 において 1 つの単一 A > G 変異を持つ ABE I I プロファイルを高効率で正確に再現するように設計された (表 4)。

40

50

【表 5】

表4: +55kb ABE IIプロファイルを生成するための最適化された組み合わせ:

sgRNA	標的配列(5'から3')	酵素	位置 (hg19)	鎖
ATF4_bs_4	CATCATCCTGGTACCAGGAA (配列番号41)	ABE8e- NRCH, NG- ABE8e, ABE8e-SpRY	chr2: 60725622- 60725641	+
ATF4_bs_5	ATCATCCTGGTACCAGGAAG (配列番号42)	ABE8e-SpRY	chr2: 60725623- 60725642	+
ATF4_bs_6	TCATCCTGGTACCAGGAAGG (配列番号43)	ABE8e-SpRY	chr2: 60725624- 60725643	+
ATF4_bs_7	CATCCTGGTACCAGGAAGGC (配列番号44)	ABE8e-SpRY	chr2: 60725625- 60725644	+

10

【0130】

20

結論として、本発明者らは、SCD HSPCにおいてより正確で、高度に効率的なBE酵素を使用することにより、+55kb BCL11Aエンハンサー領域でATF4BSを効率的に標的化することができた。

【0131】

参考文献:

本出願全体を通じて、種々の参考文献が、本発明が関係する最先端技術を記載している。これらの参考文献の開示は、本開示中への参照により本開示により組み入れられる。

30

40

50

【表 6】

Antoniou, P., Miccio, A., and Brusson, M. (2021). Base and Prime Editing Technologies for Blood Disorders. *Front. Genome Ed.* 3, 1. doi:10.3389/fgeed.2021.618406.

Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., and van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 42, e168–e168. doi:10.1093/nar/gku936.

Canver, M. C., Smith, E. C., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N. E., Shalem, O., et al. (2015). BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* 527, 192–197. doi:10.1038/nature15521.

10

Cavazzana, M., Antoniani, C., and Miccio, A. (2017). Gene Therapy for β -Hemoglobinopathies. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 25, 1142–1154. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.024.

Chandrakasan, S., and Malik, P. (2014). Gene Therapy for Hemoglobinopathies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 28, 199–216. doi:10.1016/j.hoc.2013.12.003.

20

Chang, K.-H., Smith, S. E., Sullivan, T., Chen, K., Zhou, Q., West, J. A., et al. (2017). Long-Term Engraftment and Fetal Globin Induction upon BCL11A Gene Editing in Bone-Marrow-Derived CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 4, 137–148. doi:10.1016/j.omtm.2016.12.009.

Cromer, M. K., Vaidyanathan, S., Ryan, D. E., Curry, B., Lucas, A. B., Camarena, J., et al. (2018). Global Transcriptional Response to CRISPR/Cas9-AAV6-Based Genome Editing in CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 26, 2431–2442. doi:10.1016/j.ymthe.2018.06.002.

30

40

50

- Forget, B. G. (1998). Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 850, 38–44. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb10460.x.
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5, 2108–2116. doi:10.1101/gad.5.11.2108.
- Giarratana, M.-C., Kobari, L., Lapillonne, H., Chalmers, D., Kiger, L., Cynober, T., et al. (2005). Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 69–74. doi:10.1038/nbt1047. 10
- Guda, S., Brendel, C., Renella, R., Du, P., Bauer, D. E., Canver, M. C., et al. (2015). miRNA-embedded shRNAs for Lineage-specific BCL11A Knockdown and Hemoglobin F Induction. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 23, 1465–1474. doi:10.1038/mt.2015.113.
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., and Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat. Med.* 24, 927–930. doi:10.1038/s41591-018-0049-z.
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., et al. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108, 4009–4017. doi:10.1182/blood-2006-04-015024. 20
- Huang, P., Peslak, S. A., Lan, X., Khandros, E., Yano, J. A., Sharma, M., et al. (2020). The HRI-regulated transcription factor ATF4 activates BCL11A transcription to silence fetal hemoglobin expression. *Blood* 135, 2121–2132. doi:10.1182/blood.2020005301.
- Karikó, K., Kuo, A., and Barnathan, E. (1999). Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther.* 6, 1092–1100. doi:10.1038/sj.gt.3300930.
- Kato, G. J., Piel, F. B., Reid, C. D., Gaston, M. H., Ohene-Frempong, K., Krishnamurti, L., et al. (2018). Sickle cell disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* 4, 1–22. doi:10.1038/nrdp.2018.10. 30
- Kluesner, M. G., Nedveck, D. A., Lahr, W. S., Garbe, J. R., Abrahante, J. E., Webber, B. R., et al. (2018). EditR: A Method to Quantify Base Editing from Sanger Sequencing. *CRISPR J.* 1, 239–250. doi:10.1089/crispr.2018.0014.
- Kosicki, M., Tomberg, K., and Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* 36, 765–771. doi:10.1038/nbt.4192.
- Liu, P., Keller, J. R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R. A., Nakamura, T., et al. (2003). Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat. Immunol.* 4, 525–532. doi:10.1038/ni925. 40

Milyavsky, M., Gan, O. I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., et al. (2010). A Distinctive DNA Damage Response in Human Hematopoietic Stem Cells Reveals an Apoptosis-Independent Role for p53 in Self-Renewal. *Cell Stem Cell* 7, 186–197. doi:10.1016/j.stem.2010.05.016.

Newby, G. A., Yen, J. S., Woodard, K. J., Mayuranathan, T., Lazzarotto, C. R., Li, Y., et al. (2021). Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature* 595, 295–302. doi:10.1038/s41586-021-03609-w.

10

Piel, F. B., Steinberg, M. H., and Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *N. Engl. J. Med.* 376, 1561–1573. doi:10.1056/NEJMra1510865.

Rees, H. A., and Liu, D. R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nat. Rev. Genet.* 19, 770–788. doi:10.1038/s41576-018-0059-1.

Ross, J., and Sullivan, T. D. (1985). Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes. *Blood* 66, 1149–1154.

Taher, A. T., Weatherall, D. J., and Cappellini, M. D. (2018). Thalassaemia. *The Lancet* 391, 155–167. doi:10.1016/S0140-6736(17)31822-6.

20

Weber, L., Frati, G., Felix, T., Hardouin, G., Casini, A., Wollenschlaeger, C., et al. (2020). Editing a γ -globin repressor binding site restores fetal hemoglobin synthesis and corrects the sickle cell disease phenotype. *Sci. Adv.* 6, eaay9392. doi:10.1126/sciadv.aay9392.

Wu, Y., Zeng, J., Roscoe, B. P., Liu, P., Yao, Q., Lazzarotto, C. R., et al. (2019). Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 25, 776–783. doi:10.1038/s41591-019-0401-y.

Yeh, W.-H., Chiang, H., Rees, H. A., Edge, A. S. B., and Liu, D. R. (2018). In vivo base editing of post-mitotic sensory cells. *Nat. Commun.* 9, 2184. doi:10.1038/s41467-018-04580-3.

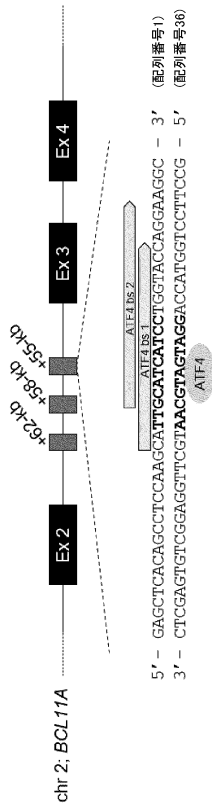
30

Yu, Y., Wang, J., Khaled, W., Burke, S., Li, P., Chen, X., et al. (2012). Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53. *J. Exp. Med.* 209, 2467–2483. doi:10.1084/jem.20121846.

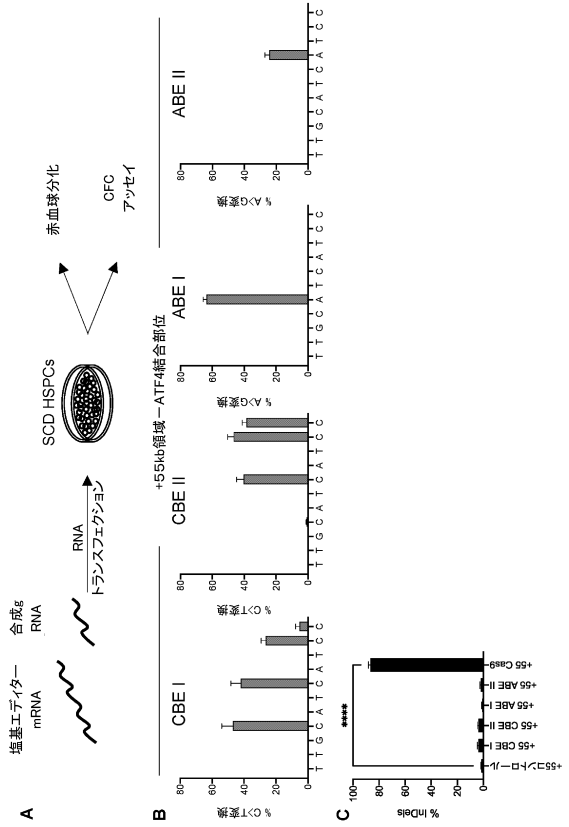
Zeng, J., Wu, Y., Ren, C., Bonanno, J., Shen, A. H., Shea, D., et al. (2020). Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 26, 535–541. doi:10.1038/s41591-020-0790-y.

40

【 図 面 】
【 図 1 】



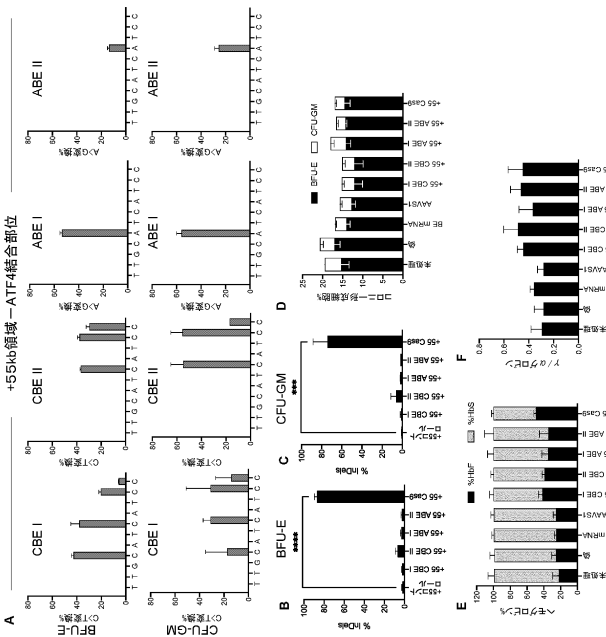
【 図 2 】



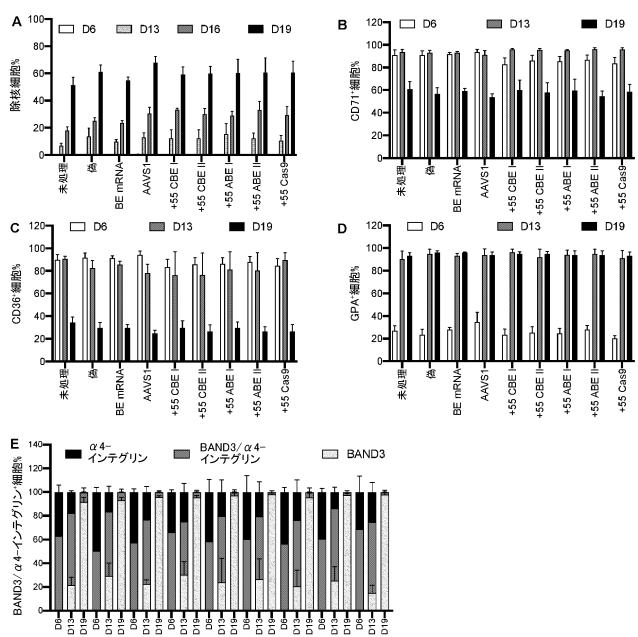
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】



30

40

50

【配列表】

2024543966000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K14/805 A61K48/00	C12N5/078 C12N5/0789 C12N15/90
	C12N5/074	
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)		
C07K C12N A61K		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/067233 A1 (CHILDRENS MEDICAL CT CORP [US]) 8 April 2021 (2021-04-08) Disruption of BCL11A +55 enhancer in order to increase expression of gamma-globin in beta-globinopathies.; paragraphs [0007] - [0019], [0026], [0036] Base editing in region of +58 enhancer in human CD34+HSPCs; paragraph [0353] - paragraph [0390]; examples 1,2 ----- -/--	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 March 2023	21/03/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bretherick, James	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083904

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ZENG JING ET AL: "Therapeutic base editing of human hematopoietic stem cells", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 26, no. 4, 16 March 2020 (2020-03-16), pages 535-541, XP037090965, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/S41591-020-0790-Y [retrieved on 2020-03-16] cited in the application abstract</p> <p>Using modified A3A base editor for editing BCL11A erythroid enhancer at position +58 Base editing viable alternative to nuclease editing of HSC-targeted therapeutic genome modification. Demonstrate that highly efficient, specific and disease-ameliorating base editing in human HSCs is feasible with RNP delivery and might encourage therapeutic application of base editing for a range of disorders in which corrected or augmented hematopoiesis could be beneficial.; page 540, column 2, paragraph 2 - paragraph 4; figures 1,2</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-21

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083904

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HUANG PENG ET AL: "The HRI-regulated transcription factor ATF4 activates BCL11A transcription to silence fetal hemoglobin expression", BLOOD</p> <p>, vol. 135, no. 24 11 June 2020 (2020-06-11), pages 2121-2132, XP055920666, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood.2020005301 Retrieved from the Internet: URL:https://watermark.silverchair.com/blood/bld/2020005301.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooa n9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAA-kwggP lBqkqhkiG9w0BBwagggPWMIID0gIBADCCA8sGCSqGS Ib3DQEhATAeBg1qhkgBZQMEAS4wEQQMZus6sbxalo-dTTg6AgEQgIIDnBOj_lRmk7SkzvnPWG4tmdct_sPX3 u_kAxeq18bgkJQQE8uZxng58XIHuUJWubkSlwpd52 5qrVG_EWwa abstract CRISPR-Cas9 guided loss-of-function genetic screen of 1446 transcription factors using HbF levels as readout, which uncovered ATF4 as a novel g-globin regulator. By combining chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq), Capture-C, and gene editing techniques, we determined that ATF4 binds to the BCL11A155 enhancer to augment enhancer-promoter contacts and stimulate BCL11A transcription. HRI knockout mice display normal levels of both Bcl11a and Bcl11a target genes, suggesting that the HRI-ATF4-BCL11A pathway is not conserved in mice. ATF4 profiling and gene editing in murine cells showed that a core-responding ATF4 element in the murine Bcl11a enhancer is largely dispensable for Bcl11a transcription, providing an explanation for the species-selective effect. Our study thus uncovers a mechanism by which HRI regulates HbF levels.; page 2121, column 2, paragraph 2 ATF4 regulates BCL11A through the155 enhancer To determine the function of ATF4 binding at the BCL11A 155 element, we disrupted it via CRISPR-Cas9</p>	1-21

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/083904

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>paragraph 3 Discussion Using a domain-focused CRISPR screen, we identified ATF4 as a novel regulator of g-globin through direct transcriptional control of BCL11A. Depletion of ATF4 or removal of the ATF4 element within the BCL11A 155 enhancer reduced BCL11A transcription. Removal of the corresponding ATF4 binding element at Bcl11a 155 enhancer in murine cells lowered Bcl11a levels only very modestly and insufficiently to reactivate BCL11A-controlled murine embryonic globin genes. Hence, the dependence of BCL11A transcription on binding of ATF4 to the BCL11A 155 enhancer varies between species. Together, these data delineate a linear HRI.ATF4.BCL11A.g-globin pathway with a species-selective component at the ATF4-BCL11A juncture (Figure 6E). The BCL11A 158 enhancer is a validated target for therapeutic genome editing.^{7,8} Our data show that disruption of the ATF4 element at the BCL11A 155 enhancer has an effect size not dissimilar to that of perturbation of the BCL11A158 enhancer in primary erythroblasts, suggesting the BCL11A +55 enhancer could serve as an additional target for therapeutic genome editing.; page 2127, column 2, paragraph 3 - page 2129, column 1, paragraph 1; figure 6A -----</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/083904

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="padding-left: 40px;"><input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.</p>
2.	<p><input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.</p>
3.	Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/083904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021067233 A1	08-04-2021	EP 4017980 A1	29-06-2022
		US 2022380757 A1	01-12-2022
		WO 2021067233 A1	08-04-2021

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)
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
C 1 2 N 5/0789(2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N 5/0735(2010.01)	C 1 2 N 5/0735	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、ブルヴァール・ドゥ・モンパルナス 2 4

(71)出願人 520053762

ユニヴェルシテ・パリ・シテ

UNIVERSITE PARIS CITE

フランス共和国, 7 5 0 0 6 パリ, ブールバール サン - ジェルマン 8 5

(74)代理人 110001508

弁理士法人 津国

(72)発明者 ミッチョ, アンナリタ

フランス国、7 5 0 1 5 パリ、ブルヴァール・デュ・モンパルナス 2 4、ユニヴェルシテ・パ
リ・デカルト、ユエムエール 1 1 6 3、アンスティテュ・イマジネ

(72)発明者 アントニウ, パナヨティス

フランス国、7 5 0 1 5 パリ、ブルヴァール・デュ・モンパルナス 2 4、アンスティテュ・イ
マジネ、ユエムエール 1 1 6 3

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 NA14 ZA51