

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7631215号  
(P7631215)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

|                         |                               |          |                         |
|-------------------------|-------------------------------|----------|-------------------------|
| (51)国際特許分類              |                               | F I      |                         |
| C 1 2 N                 | 15/09 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/09 1 1 0             |
| C 1 2 N                 | 15/88 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/88 Z Z N A           |
| A 6 1 K                 | 9/127(2025.01)                | A 6 1 K  | 9/127                   |
| A 6 1 K                 | 31/713(2006.01)               | A 6 1 K  | 31/713                  |
| A 6 1 K                 | 38/46 (2006.01)               | A 6 1 K  | 38/46                   |
| 請求項の数 28 (全389頁) 最終頁に続く |                               |          |                         |
| (21)出願番号                | 特願2021-557397(P2021-557397)   | (73)特許権者 | 518196169               |
| (86)(22)出願日             | 令和2年3月27日(2020.3.27)          |          | インテリア セラピューティクス, イン     |
| (65)公表番号                | 特表2022-525428(P2022-525428 A) |          | コーポレイテッド                |
| (43)公表日                 | 令和4年5月13日(2022.5.13)          |          | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0     |
| (86)国際出願番号              | PCT/US2020/025513             |          | 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー スト |
| (87)国際公開番号              | WO2020/198697                 | (74)代理人  | 100092783               |
| (87)国際公開日               | 令和2年10月1日(2020.10.1)          |          | 弁理士 小林 浩                |
| 審査請求日                   | 令和5年3月27日(2023.3.27)          | (74)代理人  | 100093676               |
| (31)優先権主張番号             | 62/825,637                    |          | 弁理士 小林 純子               |
| (32)優先日                 | 平成31年3月28日(2019.3.28)         | (74)代理人  | 100120134               |
| (33)優先権主張国・地域又は機関       | 米国(US)                        |          | 弁理士 大森 規雄               |
|                         |                               | (74)代理人  | 100153693               |
|                         |                               |          | 弁理士 岩田 耕一               |
|                         |                               | (72)発明者  | チャン, ヨン                 |
|                         |                               | 最終頁に続く   |                         |

(54)【発明の名称】 T T RガイドRNAと、RNAガイドDNA結合剤をコードするポリヌクレオチドとを含む組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

組成物であって、  
( i ) C a s 9をコードするオープンリーディングフレーム ( O R F )を含む核酸であって、前記O R Fが配列番号3 1 1の配列を含む、前記核酸と、  
( i i ) 配列番号8 7の配列を含む、シングルガイドRNA ( s g RNA )と、を含む、前記組成物。

【請求項2】

T T R遺伝子を修飾し、および／または前記T T R遺伝子内で二本鎖切断 ( D S B ) を誘導するために用いられる組成物であって、前記組成物が、  
( i ) C a s 9をコードするオープンリーディングフレーム ( O R F )を含む核酸であって、前記O R Fが配列番号3 1 1の配列を含む、前記核酸と、  
( i i ) 配列番号8 7の配列を含む、シングルガイドRNA ( s g RNA )と、を含む、前記組成物。

【請求項3】

対象においてT T R血清濃度を低減し、T T Rに関連するアミロイドーシス ( A T T R ) を治療し、および／またはT T Rを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防するために用いられる組成物であって、前記組成物が、  
( i ) C a s 9をコードするオープンリーディングフレーム ( O R F )を含む核酸であって、前記O R Fが配列番号3 1 1の配列を含む、前記核酸と、

( i i ) 配列番号 8 7 の配列を含む、シングルガイド RNA ( s g RNA ) と、を含む、前記組成物。

【請求項 4】

細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子内の二本鎖切断 ( D S B ) を誘導し、細胞もしくは対象において前記 T T R 遺伝子を修飾し、対象において T T R に関連するアミロイドーシス ( A T T R ) を治療し、対象において T T R 血清濃度を低減し、または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、30 分間より長い注入によって投与されるように製剤化される、請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 6】

前記組成物が、

- ( a ) 血清 T T R レベルを低減する；
- ( b ) 前記 T T R 遺伝子の編集を引き起こす；
- ( c ) 少なくとも 1 つの組織におけるアミロイド沈着を低減する；または
- ( d ) 前記 ( a ) ～ ( c ) の 2 つ以上の組み合わせである、

請求項 2 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

C a s 9 が修飾されている、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 8】

C a s 9 が、核局在化シグナル ( N L S ) を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

C a s 9 をコードする核酸が、

- ( a ) 配列番号 2 3 2 、 2 3 4 、 2 3 6 、 2 3 8 、 2 4 1 、または 2 7 5 ～ 2 7 7 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 5 ' U T R 、あるいは、
- ( b ) 配列番号 2 3 3 、 2 3 5 、 2 3 7 、 2 3 9 、または 2 4 0 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 3 ' U T R

を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 10】

C a s 9 をコードする核酸が、同じ供給源からの 5 ' U T R および 3 ' U T R を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

C a s 9 をコードする核酸が、C a p 0 、C a p 1 、および C a p 2 から選択される 5 ' キヤップを含む mRNA である、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

C a s 9 をコードする O R F を含む核酸が、配列番号 3 7 7 と少なくとも 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 9 9 . 5 % の同一性を有する配列を含む mRNA である、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 13】

C a s 9 をコードする O R F を含む核酸が、配列番号 3 7 7 の配列を含む mRNA である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

核酸が、ウリジンの少なくとも 1 0 % が修飾ウリジンで置換される mRNA である、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

修飾ウリジンが、N 1 -メチル-シュードウリジン、シュードウリジン、5 -メトキシウリジン、または 5 -ヨードウリジンのうちの 1 つ以上である、請求項 1 4 に記載の組成物。

50

## 【請求項 16】

組成物が、脂質ナノ粒子（LNP）製剤である、請求項 1～15 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 17】

LNP が、イオン性脂質、ヘルパー脂質、ステルス脂質、および中性脂質を含む、請求項 16 に記載の組成物。

## 【請求項 18】

イオン性脂質が、（9Z, 12Z）-3-（（4, 4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアートである、請求項 17 に記載の組成物。

10

## 【請求項 19】

LNP が、

（i）（9Z, 12Z）-3-（（4, 4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、

（ii）ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、

（iii）コレステロール、および

（iv）ポリエチレングリコール-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）

を含む、請求項 16 に記載の組成物。

20

## 【請求項 20】

LNP 製剤が、

（i）約 50 mol% の（9Z, 12Z）-3-（（4, 4-ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）-2-（（（（3-（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアート、

（ii）約 9 mol% のジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、

（iii）約 38 mol% のコレステロール、および

（iv）約 3 mol% のポリエチレングリコール-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）

を含む、請求項 16 に記載の組成物。

30

## 【請求項 21】

前記組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 22】

（i）前記対象が、ATTR を有する、

（ii）前記対象が、家族性アミロイドポリニューロパチーのみ、もしくは主に ATTR の神経症状を有する、または、家族性アミロイド心筋症のみ、もしくは主に ATTR の心臓症状を有する、

（iii）前記対象が、V30 変異を有する TTR を発現している、T60 変異を有する TTR を発現している、V122 変異を有する TTR を発現している、または、野生型の TTR を発現している、あるいは、

前記（i）～（iii）のうちの 2 つ以上の組み合わせである、

請求項 3～21 のいずれか一項に記載の組成物。

40

## 【請求項 23】

V30 変異が、V30A、V30G、V30L、または V30M である、請求項 22 に記載の組成物。

## 【請求項 24】

T60 変異が、T60A である、請求項 22 に記載の組成物。

## 【請求項 25】

V122 変異が、V122A、V122I、または V122（-）である、請求項 22 に

50

記載の組成物。

## 【請求項 26】

前記対象が、ヒトである、請求項 3～25 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 27】

非相同性末端結合（NHEJ）が、前記 TTR 遺伝子においてフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する前記 TTR 遺伝子における DSB の修復中に変異を引き起こす、請求項 2～26 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 28】

A T T R を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、請求項 1 または 7～27 のいずれか一項に記載の組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本特許出願は、2019年3月28日に出願された米国仮出願第62／825，637号に対する優先権を主張し、その内容は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年3月24日に作成された当該 A S C I I コピーの名称は、2020-03-24\_01155-0028-00PCT\_ST25.txtであり、サイズは451KBである。

## 【背景技術】

## 【0003】

トランスサイレチン（T T R）は、T T R 遺伝子によって生成されるタンパク質であり、通常、レチノールおよびサイロキシンを全身に輸送するように機能する。T T R は、主に肝臓で合成され、脈絡叢および網膜でほんのわずかに産生される。T T R は通常、血中の可溶性四量体タンパク質として循環する。

## 【0004】

四量体の安定性を乱し得る病原性バリエーションは、T T R 遺伝子の変異体対立遺伝子によってコードすることができる。変異体 T T R は、アミロイド（すなわち、ミスフォールディング T T R タンパク質の凝集体）を生成し得るミスフォールディング T T R を生じる場合がある。いくつかの場合では、T T R の病原性バリエーションは、アミロイドーシス、すなわち、アミロイドの蓄積から生じる疾患を引き起こし得る。例えば、ミスフォールディング T T R 単量体は、末梢神経、心臓、および消化管などの組織内のアミロイド原線維内で重合し得る。アミロイドプラークはまた、ミスフォールディング T T R 上に沈着した野生型 T T R も含み得る。

## 【0005】

また、60歳以上の男性では、野生型 T T R のミスフォールディングおよび沈着が認められ、これが心拍の問題、心不全、手根管と関連している。

## 【0006】

T T R の沈着によって特徴付けられるアミロイドーシスは、「A T T R」、「T T R 関連アミロイドーシス」、「T T R アミロイドーシス」、または「A T T R アミロイドーシス」、「A T T R 家族性アミロイドーシス」（家族内の遺伝子変異と関連する場合）、または「A T T R w t」または「野生型 A T T R」（野生型 T T R のミスフォールディングおよび沈着から生じる場合）と称され得る。

## 【0007】

A T T R は、広範囲にわたる症状を呈する場合があります、異なる種類の A T T R を有する患者は、異なる特徴および予後を有し得る。A T T R のいくつかの種類としては、家族性アミロイドポリニューロパチー（F A P）、家族性アミロイド心筋症（F A C）、および野生型 T T R アミロイドーシス（w t - T T R アミロイドーシス）が挙げられる。F A P

10

20

30

40

50

は、一般に、感覚運動ニューロパチーを呈し、一方、FACおよびwt-TTRアミロイドーシスは、一般に、うっ血性心不全を呈する。FAPおよびFACは、通常、TTR遺伝子における遺伝子変異と関連付けられ、TTR遺伝子における100を超える異なる変異は、ATTRと関連付けられている。対照的に、wt-TTRアミロイドーシスは、加齢と関連付けられ、TTRにおける遺伝子変異とは関連付けられない。世界でおよそ50,000人の患者がFAPおよびFACを患う可能性がある」と推定されている。

#### 【0008】

TTRにおける100を超える変異が、ATTRに関連するが、特定の変異が、ニューロパチーおよび／または心筋症とより密接に関連する。例えば、TTRのT60における変異は、心筋症およびニューロパチーの両方と関連し、V30における変異は、ニューロパチーの方により関連しており、V122における変異は、心筋症の方により関連している。

10

#### 【0009】

ATTRの治療のための様々な治療アプローチが研究されてきたが、疾患の進行を止め、生活の質を向上させる承認薬物は存在しない。ATTRの治療のために肝臓移植が研究されているが、顕著なリスクを伴い、移植後に疾患の進行が継続することがあるため、その使用は減少しつつある。ジフルニサルおよびタファミジスなどの小分子安定剤は、ATTRの進行を遅らせるように思われるが、これらの薬剤は、疾患の進行を止めるものではない。

#### 【0010】

20

破壊のためにアミロイド原線維を標的とする低分子干渉RNA (siRNA) ノックダウン、アンチセンスノックダウン、またはモノクローナル抗体を使用するアプローチも、現在研究されているが、TTR発現の短期間抑制に関する結果は、予備データを奨励することを示しており、TTRの長期間続く抑制を生じさせることができる治療の必要性が存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

したがって、以下の実施形態が提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、CRISPR/Cas系などのRNAガイドDNA結合剤とともにガイドRNAを用い、TTR遺伝子の発現を実質的に低減するか、またはノックアウトし、それによって、ATTRに関連するTTRタンパク質の産生を実質的に低減するか、または除去する組成物および方法を提供する。TTR遺伝子の改変によってATTRに関連するTTRタンパク質の産生を実質的に低減するか、または除去することは、長期的な低減または除去となり得る。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

以下の実施形態が本明細書で提供される。

#### 【0013】

実施形態1は、組成物であって、

40

(i) RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも93%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の50、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも93%の同一性を有するか、または少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも95%、96%、97%、

50

98%、99%、99.5%、もしくは100%が表4に列挙されるコドン、表5の低Aセット、または表5の低A/Uセットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の123%の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、核酸と、

(ii) ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターであって、ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターと、を含む、組成物である。

【0014】

実施形態2は、TTR遺伝子を修飾し、かつ／またはTTR遺伝子内で二本鎖切断(DSB)を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

(i) RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも93%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の50、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも93%の同一性を有するか、または少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%が表4に列挙されるコドン、表5の低Aセット、または表5の低A/Uセットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の123%の範囲であり、かつ／あるいは

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、核酸と、

(ii) ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターであって、ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターと、を含む、方法である。

【0015】

実施形態3は、対象においてTTR血清濃度を低減し、TTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、かつ／またはTTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、組成物が、

(i) RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. オープンリーディングフレームが、配列番号311と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいは

c. オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%が表4に列挙されるコドン、表5の低Aセット、または表5の低A/Uセットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

10

20

30

40

50

e. オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、核酸と、

(ii) ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターであって、ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターと、を含み、それによって、対象においてTTR血清濃度を低減し、TTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療し、かつ／またはTTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する、方法である。

【0016】

実施形態4は、ガイドRNAが、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択されるガイド配列を含む、先行実施形態のいずれか1つの組成物または方法である。

【0017】

実施形態5は、細胞または対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導する際に使用するための、実施形態1または4の組成物である。

【0018】

実施形態6は、細胞または対象においてTTR遺伝子を修飾する際に使用するための、実施形態1、4、または5の組成物である。

【0019】

実施形態7は、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(ATTR)を治療する際に使用するための、実施形態1、4、5、または6の組成物である。

【0020】

実施形態8は、対象においてTTR血清濃度を低減する際に使用するための、実施形態1、4、5、6、または7の組成物である。

【0021】

実施形態9は、対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、実施形態1、4、5、6、7、または8の組成物である。

【0022】

実施形態10は、本方法が、30分間より長い注入によって組成物を投与することを含む、実施形態2～9のいずれか1つの使用のための組成物または方法である。

【0023】

実施形態11は、組成物が、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、または345～375分間の注入によって投与される、実施形態10の方法または使用のための組成物である。

【0024】

実施形態12は、組成物が、約1.5～6時間の注入によって投与される、実施形態10または11の方法または使用のための組成物である。

【0025】

実施形態13は、組成物が、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、または約240分間の注入によって投与される、実施形態10の方法または使用のための組成物である。

【0026】

実施形態14は、組成物が、約120分間の注入によって投与される、実施形態10の方法または使用のための組成物である。

【0027】

実施形態15は、組成物が、血清TTRレベルを低減する、実施形態2～14のいずれ

10

20

30

40

50

か1つの方法または使用のための組成物である。

【0028】

実施形態16は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、血清TTRレベルが少なくとも50%低減される、実施形態15の方法または使用のための組成物である。

【0029】

実施形態17は、組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、50~60%、60~70%、70~80%、80~90%、90~95%、95~98%、98~99%、もしくは99~100%、血清TTRレベルを低減する、実施形態151の方法または使用のための組成物である。

【0030】

実施形態18は、組成物がTTR遺伝子の編集を引き起こす、実施形態2~17のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0031】

実施形態19は、編集が、編集される集合体のパーセンテージ（編集パーセント）として計算される、実施形態18の方法または使用のための組成物である。

【0032】

実施形態20は、編集パーセントが、集合体の30~99%である、実施形態19の方法または使用のための組成物である。

【0033】

実施形態21は、編集パーセントが、集合体の30~35%、35~40%、40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、75~80%、80~85%、85~90%、90~95%、または95~99%である、実施形態19の方法または使用のための組成物である。

【0034】

実施形態22は、組成物が、少なくとも1つの組織におけるアミロイド沈着を低減する、実施形態2~21のいずれか1つの実施形態のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0035】

実施形態23は、少なくとも1つの組織が、胃、結腸、坐骨神経、または後根神経節のうちの1つ以上を含む、実施形態22の方法または使用のための組成物である。

【0036】

実施形態24は、アミロイド沈着が、組成物の投与の8週間後に測定される、実施形態22または23の方法または使用のための組成物である。

【0037】

実施形態25は、アミロイド沈着が、陰性対照、または組成物の投与前に測定されるレベルと比較される、実施形態22~24のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0038】

実施形態26は、アミロイド沈着が、生検試料において、および／または免疫染色によって測定される、実施形態22~25のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0039】

実施形態27は、アミロイド沈着が、陰性対照においてみられるアミロイド沈着の30~35%、35~40%、40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、75~80%、80~85%、85~90%、90~95%、または95~99%低減する、実施形態22~26のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0040】

実施形態28は、アミロイド沈着が、組成物の投与前にみられるアミロイド沈着の30~35%、35~40%、40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、

10

20

30

40

50



60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、実施形態22～27のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0041】

実施形態29は、組成物が、少なくとも2回投与または送達される、実施形態2～28のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0042】

実施形態30は、組成物が、少なくとも3回投与または送達される、実施形態29の方法または使用のための組成物である。

【0043】

実施形態31は、組成物が、少なくとも4回投与または送達される、実施形態29の方法または使用のための組成物である。

【0044】

実施形態32は、組成物が、5回、6回、7回、8回、9回、または10回まで投与または送達される、実施形態29の方法または使用のための組成物である。

【0045】

実施形態33は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15日間の間隔で行われる、実施形態29～32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0046】

実施形態34は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15週間の間隔で行われる、実施形態29～32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0047】

実施形態35は、投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15ヶ月間の間隔で行われる、実施形態29～32のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0048】

実施形態36は、ガイドRNAが、ガイド配列を含み、かつ配列番号126のヌクレオチド配列をさらに含むcrRNAを含み、配列番号126のヌクレオチドが、ガイド配列にその3'末端で続く、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0049】

実施形態37は、ガイドRNAが、デュアルガイド(dgRNA)である、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0050】

実施形態38は、デュアルガイドRNAが、配列番号126のヌクレオチド配列を含み、配列番号126のヌクレオチドがガイド配列にその3'末端で続くcrRNAと、trRNAと、を含む、実施形態37の方法または組成物である。

【0051】

実施形態39は、ガイドRNAが、シングルガイド(sgRNA)である、実施形態1～36のいずれか1つの方法または組成物である。

【0052】

実施形態40は、sgRNAが、配列番号3のパターンを有するガイド配列を含む、実施形態39の方法または組成物である。

【0053】

実施形態41は、sgRNAが、配列番号3の配列を含む、実施形態39の方法または組成物である。

【0054】

実施形態42は、sgRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列、ならびに配列番号126のヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、実施

10

20

30

40

50

形態 39～41 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0055】

実施形態 43 は、sgRNA が、配列番号 87～113、115～120、および 122～124 から選択される配列と少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一である配列を含む、実施形態 39～42 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0056】

実施形態 44 は、sgRNA が、配列番号 87～113、115～120、および 122～124 から選択される配列を含む、実施形態 39 の方法または組成物である。

【0057】

実施形態 45 は、ガイド RNA が、少なくとも 1 つの修飾を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0058】

実施形態 46 は、少なくとも 1 つの修飾が、2'-O-メチル (2'-O-Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 45 の方法または組成物である。

【0059】

実施形態 47 は、少なくとも 1 つの修飾が、ヌクレオチド間ホスホロチオエート (PS) 結合を含む、実施形態 45 または 46 の方法または組成物である。

【0060】

実施形態 48 は、少なくとも 1 つの修飾が、2'-フルオロ (2'-F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 45～47 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0061】

実施形態 49 は、少なくとも 1 つの修飾が、5' 末端における最初の 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上における修飾を含む、実施形態 45～48 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0062】

実施形態 50 は、少なくとも 1 つの修飾が、3' 末端における最後の 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上における修飾を含む、実施形態 45～49 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0063】

実施形態 51 は、少なくとも 1 つの修飾が、最初の 4 個のヌクレオチド間の PS 結合を含む、実施形態 45～50 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0064】

実施形態 52 は、少なくとも 1 つの修飾が、最後の 4 個のヌクレオチド間の PS 結合を含む、実施形態 45～51 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0065】

実施形態 53 は、少なくとも 1 つの修飾が、5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 45～52 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0066】

実施形態 54 は、少なくとも 1 つの修飾が、3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドに 2'-O-Me 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 45～53 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0067】

実施形態 55 は、ガイド RNA が、配列番号 3 の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 45～54 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0068】

実施形態 56 は、組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、実施形態 1～5 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0069】

実施形態 57 は、ガイド RNA および RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸が、脂質ナノ粒子 (LNP) と会合している、実施形態 1 ~ 56 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0070】

実施形態 58 は、LNP が、CCD 脂質を含む、実施形態 57 の方法または組成物である。

【0071】

実施形態 59 は、CCD 脂質が、脂質 A または脂質 B であり、任意選択で、CCD 脂質が、脂質 A である、実施形態 58 の方法または組成物である。

【0072】

実施形態 60 は、LNP が、ヘルパー脂質を含む、実施形態 57 ~ 59 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0073】

実施形態 61 は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態 60 の方法または組成物である。

【0074】

実施形態 62 は、LNP が、ステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) を含む、実施形態 57 ~ 61 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0075】

実施形態 63 は、ステルス脂質が、PEG 2k-DMG である、実施形態 62 の方法または組成物である。

【0076】

実施形態 64 は、

(i) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 50 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 8 ~ 10 mol% の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が、約 6 であり、

(ii) LNP が、約 50 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 27 ~ 39.5 mol% のヘルパー脂質と、約 8 ~ 10 mol% の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、LNP 組成物の N/P 比が、約 5 ~ 7 (例えば、約 6) であり、

(iii) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 50 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ~ 15 mol% の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が約 3 ~ 10 であり、

(iv) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 40 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ~ 15 mol% の中性脂質と、約 2.5 ~ 4 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が、約 6 であり、

(v) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 50 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 5 ~ 15 mol% の中性脂質と、約 1.5 ~ 10 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が、約 6 であり、

(vi) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 40 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 0 ~ 10 mol% の中性脂質と、約 1.5 ~ 10 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組成物の N/P 比が、約 3 ~ 10 であり、

(vii) LNP が、脂質成分を含み、脂質成分が、約 40 ~ 60 mol% の脂質 A などのアミン脂質と、約 1 mol% 未満の中性脂質と、約 1.5 ~ 10 mol% のステルス脂質 (例えば、PEG 脂質) とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP 組

10

20

30

40

50

成物のN／P比が約3～10であり、

(viii) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN／P比が約3～10であり、LNP組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、または含まず、あるいは

(ix) LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN／P比が約3～7である、実施形態57～63のいずれか1つの方法または組成物である。

10

【0077】

実施形態64aは、PEG脂質のmol%が、約3である、実施形態64の方法または組成物である。

【0078】

実施形態64bは、アミン脂質のmol%が、約50である、実施形態64または64aの方法または組成物である。

【0079】

実施形態64cは、アミン脂質のmol%が、約55である、実施形態64～64bのいずれか1つの方法または組成物である。

【0080】

実施形態64dは、アミン脂質のmol%が、±3mol%である、実施形態64～64cのいずれか1つの方法または組成物である。

20

【0081】

実施形態64eは、アミン脂質のmol%が、±2mol%である、実施形態64～64dのいずれか1つの方法または組成物である。

【0082】

実施形態64fは、アミン脂質のmol%が、47～53mol%である、実施形態64～64eのいずれか1つの方法または組成物である。

【0083】

実施形態64gは、アミン脂質のmol%が、48～53mol%である、実施形態64～64fのいずれか1つの方法または組成物である。

30

【0084】

実施形態64hは、アミン脂質のmol%が、53～57mol%である、実施形態64～64gのいずれか1つの方法または組成物である。

【0085】

実施形態64iは、N／P比が、6±1である、実施形態64～64hのいずれか1つの方法または組成物である。

【0086】

実施形態64jは、N／P比が、6±0.5である、実施形態64～64iのいずれか1つの方法または組成物である。

40

【0087】

実施形態64kは、アミン脂質が、脂質Aである、実施形態64～64jのいずれか1つの方法または組成物である。

【0088】

実施形態64lは、アミン脂質が、脂質Aの類似体である、実施形態64～64kのいずれか1つの方法または組成物である。

【0089】

実施形態64mは、類似体が、アセタール類似体である、実施形態64lの方法または組成物である。

【0090】

50

実施形態 6 4 n は、アセタール類似体が、C 4 ~ C 1 2 アセタール類似体である、実施形態 6 4 m の方法または組成物である。

【0 0 9 1】

実施形態 6 4 o は、アセタール類似体が、C 5 ~ C 1 2 アセタール類似体である、実施形態 6 4 m の方法または組成物である。

【0 0 9 2】

実施形態 6 4 p は、アセタール類似体が、C 5 ~ C 1 0 アセタール類似体である、実施形態 6 4 m の方法または組成物である。

【0 0 9 3】

実施形態 6 4 q は、アセタール類似体が、C 4、C 5、C 6、C 7、C 9、C 1 0、C 1 1、および C 1 2 類似体から選択される、実施形態 6 4 m の方法または組成物である。

10

【0 0 9 4】

実施形態 6 4 r は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態 6 4 ~ 6 4 q のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 0 9 5】

実施形態 6 4 s は、中性脂質が、D S P C である、実施形態 6 4 ~ 6 4 r のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 0 9 6】

実施形態 6 4 t は、中性脂質が、D P P C である、実施形態 6 4 ~ 6 4 s のいずれか 1 つの方法または組成物である。

20

【0 0 9 7】

実施形態 6 4 u は、P E G 脂質が、ジミリストイルグリセロール (D M G) を含む、実施形態 6 4 ~ 6 4 t のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 0 9 8】

実施形態 6 4 v は、P E G 脂質が、P E G - 2 k を含む、実施形態 6 4 ~ 6 4 u のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 0 9 9】

実施形態 6 4 w は、P E G 脂質が、P E G - D M G である、実施形態 6 4 ~ 6 4 v のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 1 0 0】

30

実施形態 6 4 x は、P E G - D M G が、P E G 2 k - D M G である、実施形態 6 4 w の方法または組成物である。

【0 1 0 1】

実施形態 6 4 y は、L N P 組成物が、中性脂質を本質的に含まない、実施形態 6 4 ~ 6 4 x のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 1 0 2】

実施形態 6 4 z は、中性脂質が、リン脂質である、実施形態 6 4 y の方法または組成物である。

【0 1 0 3】

実施形態 6 5 は、L N P が、中性脂質を含み、任意選択で、中性脂質が、D S P C である、実施形態 5 7 ~ 6 4 z のいずれか 1 つの方法または組成物である。

40

【0 1 0 4】

実施形態 6 6 は、アミン脂質が、約 5 0 m o l % で存在する、実施形態 6 4 または 6 5 の方法または組成物である。

【0 1 0 5】

実施形態 6 7 は、中性脂質が、約 9 m o l % で存在する、実施形態 6 4 ~ 6 6 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0 1 0 6】

実施形態 6 8 は、ステルス脂質が、約 3 m o l % で存在する、実施形態 6 2 ~ 6 7 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

50

## 【0107】

実施形態69は、ヘルパー脂質が、約38mol%で存在する、実施形態60～68のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0108】

実施形態70は、LNPが、約6のN/P比を有する、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0109】

実施形態71は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態70の方法または組成物である。

10

## 【0110】

実施形態72は、アミン脂質が、脂質Aである、実施形態64～71のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0111】

実施形態73は、中性脂質が、DSPCである、実施形態64～72のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0112】

実施形態74は、ステルス脂質が、PEG2k-DMGである、実施形態62～73のいずれか1つの方法または組成物である。

20

## 【0113】

実施形態75は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態60～74のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0114】

実施形態76は、LNPが、脂質成分を含み、脂質成分が、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約6である、実施形態70のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0115】

実施形態77は、RNAガイドDNA結合剤が、Casクリパーゼである、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

30

## 【0116】

実施形態78は、RNAガイドDNA結合剤が、Cas9である、実施形態77の方法または組成物である。

## 【0117】

実施形態79は、RNAガイドDNA結合剤が修飾されている、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0118】

実施形態80は、修飾されたRNAガイドDNA結合剤が、核局在化シグナル（NLS）を含む、実施形態79の方法または組成物である。

40

## 【0119】

実施形態81は、RNAガイドDNA結合剤が、II型CRISPR/Cas系由来のCasである、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0120】

実施形態82は、組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

## 【0121】

実施形態83は、組成物が、TTRを含むアミロイドまたはアミロイド原線維を低減または予防する、実施形態2～82のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

50

## 【0122】

実施形態84は、アミロイドまたはアミロイド原線維が、神経、心臓、または消化管内のものである、実施形態83の方法または使用のための組成物である。

## 【0123】

実施形態85は、非相同性末端結合（NHEJ）が、TTR遺伝子におけるDSBの修復中に変異を引き起こす、実施形態2～84のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

## 【0124】

実施形態86は、NHEJが、TTR遺伝子におけるDSBの修復中にヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こす、実施形態85の方法または使用のための組成物である。

## 【0125】

実施形態87は、ヌクレオチド変異の欠失または挿入が、TTR遺伝子においてフレームシフトまたはナンセンスを誘導する、実施形態86の方法または使用のための組成物である。

## 【0126】

実施形態88は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の少なくとも50%のTTR遺伝子において誘導される、実施形態86の方法または使用のための組成物である。

## 【0127】

実施形態89は、フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の50%～60%、60%～70%、70%または80%、80%～90%、90～95%、95%～99%、または99%～100%のTTR遺伝子において誘導される、実施形態88の方法または使用のための組成物である。

## 【0128】

実施形態90は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも50倍以上生じる、実施形態86～89のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

## 【0129】

実施形態91は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、TTR遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも50倍～150倍、150倍～500倍、500倍～1500倍、1500倍～5000倍、5000倍～15000倍、15000倍～30000倍、または30000倍～60000倍多く生じる、実施形態90の方法または使用のための組成物である。

## 【0130】

実施形態92は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、初代ヒト肝細胞において3個以下、2個以下、1個以下、または0個のオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域では生じない、実施形態86～91のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

## 【0131】

実施形態93は、ヌクレオチドの欠失または挿入が、Cas9を過剰発現する細胞においてヌクレオチドの欠失または挿入が生じるオフターゲット部位の数より少ない数の初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位で生じ、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態92の方法または使用のための組成物である。

## 【0132】

実施形態94は、Cas9を過剰発現する細胞が、Cas9を安定して発現するHEK293細胞である、実施形態93の方法または使用のための組成物である。

## 【0133】

実施形態95は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNAおよびガイドRNAでインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲ

10

20

30

40

50

ノムDNAを分析することによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態92～94のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0134】

実施形態96は、初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、Cas9 mRNA、ガイドRNAおよびドナーオリゴヌクレオチドでインビトロでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することを含むオリゴヌクレオチド挿入アッセイによって決定され、任意選択で、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生しない、実施形態92～94のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

10

【0135】

実施形態97は、ガイドRNAの配列が、

- a) 配列番号92もしくは104、
- b) 配列番号87、89、96、もしくは113、
- c) 配列番号100、102、106、111、もしくは112、または
- d) 配列番号88、90、91、93、94、95、97、101、103、108、もしくは109である、実施形態1～36または39～96のいずれか1つの方法または組成物である。

【0136】

実施形態98は、ガイドRNAが、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生するオフターゲット部位でインデルを生成しない、実施形態97の方法または組成物である。

20

【0137】

実施形態99は、組成物を投与することで、対象におけるTTRのレベルを低減する、実施形態2～98のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0138】

実施形態100は、TTRのレベルが、少なくとも50%低減する、実施形態99の方法または使用のための組成物である。

【0139】

実施形態101は、TTRのレベルが、50%～60%、60%～70%、70%または80%、80%～90%、90～95%、95%～99%、または99%～100%低減する、実施形態100の方法または使用のための組成物である。

30

【0140】

実施形態102は、TTRのレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、または喀痰において測定される、実施形態100または101の方法または使用のための組成物である。

【0141】

実施形態103は、TTRのレベルが、肝臓、脈絡叢、および／または網膜において測定される、実施形態100または101の方法または使用のための組成物である。

【0142】

実施形態104は、TTRのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を介して測定される、実施形態99～103のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

40

【0143】

実施形態105は、対象が、ATTRを有する、実施形態2～104のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0144】

実施形態106は、対象が、ヒトである、実施形態2～105のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0145】

実施形態107は、対象が、ATTRwtを有する、実施形態105または106の方

50



法または使用のための組成物である。

【0146】

実施形態108は、対象が、遺伝性ATTRを有する、実施形態105または106の方法または使用のための組成物である。

【0147】

実施形態109は、対象が、ATTRの家族歴を有する、実施形態2～106または108のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0148】

実施形態110は、対象が、家族性アミロイドポリニューロパチーを有する、実施形態2～106または108～109のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0149】

実施形態111は、対象が、ATTRの神経症状のみ、または主にATTRの神経症状を有する、実施形態2～110のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0150】

実施形態112は、対象が、家族性アミロイド心筋症を有する、実施形態2～111のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0151】

実施形態113は、対象が、ATTRの心臓症状のみ、または主にATTRの心臓症状を有する、実施形態2～110または112のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0152】

実施形態114は、対象が、V30変異を有するTTRを発現する、実施形態2～113のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0153】

実施形態115は、V30変異が、V30A、V30G、V30L、またはV30Mである、実施形態114の方法または使用のための組成物である。

【0154】

実施形態116は、対象が、T60変異を有するTTRを発現する、実施形態2～113のいずれか1つの実施形態の方法または使用のための組成物である。

【0155】

実施形態117は、T60変異が、T60Aである、実施形態116の方法または使用のための組成物である。

【0156】

実施形態118は、対象が、V122変異を有するTTRを発現する、実施形態2～113のいずれか1つの実施形態の方法または使用のための組成物である。

【0157】

実施形態119は、V122変異が、V122A、V122I、またはV122(－)である、実施形態118の方法または使用のための組成物である。

【0158】

実施形態120は、対象が、野生型TTRを発現する、実施形態2～113のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0159】

実施形態121は、対象が、V30、T60、またはV122変異を有するTTRを発現しない、実施形態2～107、または120のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0160】

実施形態122は、対象が、病的な変異を有するTTRを発現しない、実施形態2～107、または120～121のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0161】

実施形態123は、対象が、野生型TTRについてホモ接合である、実施形態122の

10

20

30

40

50

方法または使用のための組成物である。

【0162】

実施形態124は、対象が、投与後に、感覚運動ニューロパチーの症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、実施形態2～123のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0163】

実施形態125は、感覚運動ニューロパチーが改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、筋電図、神経伝導検査、または患者が報告する転帰を使用して測定される、実施形態124の方法または使用のための組成物である。

【0164】

実施形態126は、対象が、うっ血性心不全の症状が改善し、安定化し、または変化が遅くなる、実施形態2～125のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0165】

実施形態127は、うっ血性心不全が改善し、安定化し、または変化が遅くなることが、心臓バイオマーカー検査、肺機能検査、胸部x線、または心電図法を使用して測定される、実施形態126の方法または使用のための組成物である。

【0166】

実施形態128は、組成物または薬学的製剤が、ウイルスベクターを介して投与される、実施形態2～127のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0167】

実施形態129は、組成物または薬学的製剤が、脂質ナノ粒子を介して投与される、実施形態2～127のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0168】

実施形態130は、対象が、組成物または製剤を投与する前に、TTR遺伝子内の特定の変異について試験される、実施形態2～129のいずれか1つの方法または使用のための組成物である。

【0169】

実施形態131は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または69である、先行実施形態のいずれか1つの方法または組成物である。

【0170】

実施形態132は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号5である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0171】

実施形態133は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号6である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0172】

実施形態134は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号7である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0173】

実施形態135は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号8である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0174】

実施形態136は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号9である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

10

20

30

40

50

る。

【0175】

実施形態137は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号10である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0176】

実施形態138は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号11である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0177】

実施形態139は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号12である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0178】

実施形態140は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号13である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0179】

実施形態141は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号14である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0180】

実施形態142は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号15である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0181】

実施形態143は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号16である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0182】

実施形態144は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号17である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0183】

実施形態145は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号18である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0184】

実施形態146は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号19である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0185】

実施形態147は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号20である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0186】

実施形態148は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号21である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0187】

10

20

30

40

50

実施形態 149 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 22 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0188】

実施形態 150 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 23 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0189】

実施形態 151 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 24 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

10

【0190】

実施形態 152 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 25 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0191】

実施形態 153 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 26 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0192】

20

実施形態 154 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 27 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0193】

実施形態 155 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 28 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0194】

実施形態 156 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 29 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

30

【0195】

実施形態 157 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 30 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0196】

実施形態 158 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 31 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0197】

40

実施形態 159 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 32 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0198】

実施形態 160 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 33 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0199】

実施形態 161 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 34 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物で

50

ある。

【0200】

実施形態162は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号35である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0201】

実施形態163は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号36である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0202】

実施形態164は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号37である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0203】

実施形態165は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号38である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0204】

実施形態166は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号39である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0205】

実施形態167は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号40である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0206】

実施形態168は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号41である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0207】

実施形態169は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号42である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0208】

実施形態170は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号43である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0209】

実施形態171は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号44である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0210】

実施形態172は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号45である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0211】

実施形態173は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号46である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0212】

10

20

30

40

50

実施形態 174 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 47 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0213】

実施形態 175 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 48 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0214】

実施形態 176 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 49 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0215】

実施形態 177 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 50 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0216】

実施形態 178 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 51 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0217】

実施形態 179 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 52 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0218】

実施形態 180 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 53 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0219】

実施形態 181 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 54 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0220】

実施形態 182 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 55 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0221】

実施形態 183 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 56 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0222】

実施形態 184 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 57 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0223】

実施形態 185 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 58 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0224】

実施形態 186 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 59 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物で

10

20

30

40

50

ある。

【0225】

実施形態187は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号60である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0226】

実施形態188は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号61である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0227】

実施形態189は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号62である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0228】

実施形態190は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号63である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0229】

実施形態191は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号64である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0230】

実施形態192は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号65である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0231】

実施形態193は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号66である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0232】

実施形態194は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号67である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0233】

実施形態195は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号68である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0234】

実施形態196は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号69である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0235】

実施形態197は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号70である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0236】

実施形態198は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列が、配列番号71である、実施形態1～130のいずれか1つの方法または組成物である。

【0237】

10

20

30

40

50

実施形態 199 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 72 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0238】

実施形態 200 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 74 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0239】

実施形態 201 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 75 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0240】

実施形態 202 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 76 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0241】

実施形態 203 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 77 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0242】

実施形態 204 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 78 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0243】

実施形態 205 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 80 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0244】

実施形態 206 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 81 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0245】

実施形態 207 は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列が、配列番号 82 である、実施形態 1～130 のいずれか 1 つの方法または組成物である。

【0246】

実施形態 208 は、オープンリーディングフレームが、その配列の少なくともその最初の 10%、12%、15%、20%、25%、30%、または 35% にわたって配列番号 311 と少なくとも 95% の同一性を有する、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0247】

実施形態 209 は、オープンリーディングフレームが、配列番号 311 と少なくとも 94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または 100% の同一性を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0248】

実施形態 210 は、オープンリーディングフレームのコドンの少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または 100% が、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンである、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0249】

実施形態 211 は、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンが、表 4 に列挙される

10

20

30

40

50



コドンである、実施形態 210 の組成物または方法である。

【0250】

実施形態 212 は、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンが、表 5 の低 U コドンセットのコドンである、実施形態 210 の組成物または方法である。

【0251】

実施形態 213 は、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンが、表 5 の低 A コドンセットのコドンである、実施形態 210 の組成物または方法である。

【0252】

実施形態 214 は、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンが、表 5 の低 A / U コドンセットのコドンである、実施形態 210 の組成物または方法である。

【0253】

実施形態 215 は、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンが、表 7 に列挙されるコドンである、実施形態 210 の組成物または方法である。

【0254】

実施形態 216 は、オープンリーディングフレームが、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 101%、102%、103%、105%、110%、115%、120%、または 123% の範囲である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0255】

実施形態 217 は、オープンリーディングフレームが、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 101%、102%、103%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、または 150% の範囲である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0256】

実施形態 218 は、核酸が、配列番号 232、234、236、238、241、または 275～277 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の同一性を有する 5' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0257】

実施形態 219 は、核酸が、配列番号 233、235、237、239、または 240 のいずれか 1 つと少なくとも 90% の同一性を有する 3' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0258】

実施形態 220 は、核酸が、同じ供給源からの 5' UTR および 3' UTR を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0259】

実施形態 221 は、核酸が、Cap0、Cap1、および Cap2 から選択される 5' キヤップを含む mRNA である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0260】

実施形態 222 は、オープンリーディングフレームが、配列番号 377 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または 100% の同一性を有する配列を含む、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0261】

実施形態 223 は、核酸が、ウリジンの少なくとも 10% が修飾ウリジンで置換される mRNA である、先行実施形態のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0262】

実施形態 224 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジン、シュードウリジン、5-メトキシウリジン、または 5-ヨードウリジンのうちの 1 つ以上である、実施形態 223 の組成物または方法である。

【0263】

10

20

30

40

50

実施形態 225 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジンまたは 5-メトキシウリジンのうちの片方または両方である、実施形態 223 の組成物または方法である。

【0264】

実施形態 226 は、修飾ウリジンが、N1-メチル-シュードウリジンである、実施形態 223 の組成物または方法である。

【0265】

実施形態 227 は、修飾ウリジンが、5-メトキシウリジンである、実施形態 223 の組成物または方法である。

【0266】

実施形態 228 は、mRNA 中のウリジンの 15%~45% が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 223~210 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0267】

実施形態 229 は、mRNA 中のウリジンの少なくとも 20% または少なくとも 30% が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 223~211 のいずれか 1 つの組成物または方法である。

【0268】

実施形態 230 は、mRNA 中のウリジンの少なくとも 80% または少なくとも 90% が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 229 の組成物または方法である。

【0269】

実施形態 231 は、mRNA 中のウリジンの 100% が、修飾ウリジンで置換されている、実施形態 229 の組成物または方法である。

【0270】

実施形態 232 は、ATTR を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、実施形態 1 または 4~231 のいずれかの組成物または製剤の使用である。

【図面の簡単な説明】

【0271】

【図 1A】 実施例 2 に記載されるような 2 名のドナーからの初代ヒト肝細胞における編集 % を示す。

【図 1B】 (上記 (図 1A) の通り。)

【図 2】 実施例 2 に記載されるような初代カニクイザル肝細胞における編集 % を示す。

【図 3A】 LNP の 30 分間投与を、長い投薬プロトコルと比較した、非ヒト霊長類におけるインビボ研究での血清 TTR レベル (図 3A)、肝臓 TTR 編集 (図 3B)、および循環 ALP レベル (図 3C) を示す。

【図 3B】 (上記の通り。)

【図 3C】 (上記の通り。)

【発明を実施するための形態】

【0272】

ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本発明は例示される実施形態と併せて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。これとは逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明内に含まれ得る、すべての代替物、改変物、および均等物を網羅することが意図される。

【0273】

本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는ように、単数形「1 つの (a)」、「1 つの (an)」、および「その (the)」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含むことに留意されたい。したがって、例えば、「コンジュゲート (a conjugate)」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞 (a cell)」への言及は、複数の細胞を含むなどである。

10

20

30

40

50

## 【0274】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値および測定可能な値は、有意な桁および測定に関連する誤差を考慮して、おおよその値であると理解される。また、「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含有する (contain)」、「含有する (contains)」、「含有する (containing)」、「含む (include)」、「含む (includes)」、および「含む (including)」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。

10

## 【0275】

上の明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む (comprising)」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む (comprising)」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む (comprising)」ものであると想定される（この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない）。「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、包括的な意味で、すなわち、「および／または」に等しい意味で使用される。

20

## 【0276】

本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそのような実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、改変物、および均等物を包含する。

## 【0277】

## I. 定義

特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語および句は、以下の意味を有することを意図する。

30

## 【0278】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基または塩基類似体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体（従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、およびそれらの類似体であるポリマーを含む）を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合（「ペプチド核酸」またはPNA、PCT第WO95/32305号）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、2'メトキシまたは2'ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基（A、G、C、T、U）、その類似体（例えば、5-メトキシウリジン、シュードウリジン、もしくはN1-メチルシュードウリジン等の修飾ウリジン）、イノシン、プリンもしくはピリミジンの誘導体（例えば、N4-メチルデオキシグアノシン、デアザーもしくはアザープリン、デアザーもしくはアザーピリミジン、5位もしくは6位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、5-メチルシトシン）、2、6、もしくは8位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O6-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、およびO4-アルキル-ピリミジン、米国特許第5,378,825号およびPCT第WO93/13121号）であってもよい。

40

50

一般的な考察については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36、Adams et al. 編集、11<sup>th</sup> ed., 1992を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置に窒素系塩基を含まない1つ以上の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第5,585,481号）。核酸は、従来のRNAもしくはDNA糖、塩基および連結のみを含んでいてもよく、または従来の構成要素および置換の両方（例えば、2'メトキシ連結を有する従来の塩基、または従来の塩基および1つ以上の塩基類似体の両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、RNA模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なRNAおよびDNA配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、1つ以上のLNAヌクレオチドモノマーを含有する類似体である「ロックド核酸」（LNA）を含む（Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41）。RNAおよびDNAは異なる糖部分を有し、RNA内のウラシルもしくはその類似体およびDNA内のチミンもしくはその類似体の存在によって異なり得る。

【0279】

本明細書で使用される「ポリペプチド」は、三次元立体配座を採用することができるアミノ酸残基を含む多量体化合物を指す。ポリペプチドには、限定されないが、酵素、酵素前駆体タンパク質、調節タンパク質、構造タンパク質、受容体、核酸結合タンパク質、抗体などが含まれる。ポリペプチドは、翻訳後修飾、非天然アミノ酸、人工基などを含んでよいが、必ずしもそうではない。

【0280】

「ガイドRNA」、「gRNA」、および「ガイド」は、crRNA（CRISPR RNAとしても既知である）、またはcrRNAおよびtrRNAの組み合わせ（tracrRNAとしても既知である）のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。crRNAおよびtrRNAは、一本鎖RNA分子（シングルガイドRNA、sgRNA）として会合し得るか、または2つの別々のRNA分子（デュアルガイドRNA、dgRNA）において会合し得る。「ガイドRNA」または「gRNA」は、各種類を指す。trRNAは、天然に存在する配列、または天然に存在する配列と比較して修飾もしくは多様性を有するtrRNA配列であり得る。ガイドRNAは、本明細書に記載されるような修飾RNAを含み得る。

【0281】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、RNAガイドDNA結合剤による結合または修飾（例えば、切断）のための標的配列に対してガイドRNAを指向させるように機能する、ガイドRNA内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Streptococcus pyogenes（すなわち、SpyCas9）および関連するCas9ホモログ／オルソログの場合、20塩基対の長さであり得る。例えば、15、16、17、18、19、21、22、23、24、または25のヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。いくつかの実施形態において、ガイド配列と標的配列とは、100%相補的または同一である。他の実施形態において、ガイド配列と標的配列とは、少なくとも1個のミスマッチを含有していてもよい。例えば、ガイド配列および標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態において、ガイド配列および標的配列は、1～4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも17、18、19、20個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ガイド配列および標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、20個のヌクレオチドを含む。

【0282】

Casタンパク質の核酸基質は二本鎖核酸であるため、Casタンパク質の標的配列は、ゲノムDNAのプラス鎖およびマイナス鎖（すなわち、与えられる配列およびその配列

10

20

30

40

50

の逆相補体)の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドRNAを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態において、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるUのTへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド(例えばPAMを含まない標的配列)と同一である。

#### 【0283】

本明細書で使用される場合、「RNAガイドDNA結合剤」は、RNAおよびDNA結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のDNA結合サブユニットを意味し、DNA結合活性は、配列特異的であり、RNAの配列に依存する。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、Casクリパーゼ(cleavase)／ニッカーゼおよびその不活性化形態(「dCas DNA結合剤」)が含まれる。本明細書で使用される「Casタンパク質」とも称される「Casヌクレアーゼ」には、Casクリパーゼ、Casニッカーゼ、およびdCas DNA結合剤が包含される。Casクリパーゼ／ニッカーゼおよびdCas DNA結合剤には、III型CRISPR系のCsmまたはCmr複合体、Cas10、Csm1、またはそのCmr2サブユニット、I型CRISPR系のカスケード複合体、そのCas3サブユニットおよびクラス2Casヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス2Casヌクレアーゼ」は、Cas9ヌクレアーゼまたはCpf1ヌクレアーゼなどの、RNAガイドDNA結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス2Casヌクレアーゼには、RNAガイドDNAクリパーゼまたはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2Casクリパーゼおよびクラス2Casニッカーゼ(例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション)、ならびにクリパーゼ／ニッカーゼ活性が不活性化されているクラス2dCas DNA結合剤が含まれる。クラス2Casヌクレアーゼには、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、C2c3、HF Cas9(例えば、N497A、R661A、Q695A、Q926Aバリエーション)、HypaCas9(例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション)、eSPCas9(1.0)(例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション)、およびeSPCas9(1.1)(例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション)タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cpf1タンパク質(Zetsche et al., Cell, 163:1-13(2015))は、Cas9と相同性であり、RuvC様ヌクレアーゼドメインを含む。ZetscheのCpf1配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Zetscheの表S1およびS3を参照。「Cas9」は、Spy Cas9、本明細書に列挙されるCas9のバリエーション、およびそれらの等価物を包含する。例えば、Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36(2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397(2015)を参照されたい。

#### 【0284】

「修飾ウリジン」は、本明細書では、ウリジンと同じ水素結合受容体を有し、ウリジンとは1つ以上の構造的差異を有する、チミジン以外のヌクレオシドを指すために使用される。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基(例えば、アルコキシ、例えば、メトキシ)がプロトンの代わりに置かれるウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換シュードウリジン、すなわち、1つ以上の非プロトン置換基(例えば、アルキル、例えば、メチル)がプロトンの代わりに置かれるシュードウリジン、例えば、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、置換ウリジン、シュードウリジン、または置換シュードウリジンのうちのいずれかである。

#### 【0285】

本明細書で使用される「ウリジン位置」は、ウリジンまたは修飾ウリジンによって占有

されるポリヌクレオチド中の位置を指す。したがって、例えば、「ウリジン位置の100%が修飾ウリジンである」ポリヌクレオチドは、同じ配列の従来のRNA（すべての塩基が標準的なA、U、C、またはG塩基である）中のウリジンであり得るすべての位置に修飾ウリジンを含む。別に指示されない限り、本開示中またはそれに付随する配列表（sequence table）または配列表（sequence listing）のポリヌクレオチド配列中のUは、ウリジンまたは修飾ウリジンであり得る。

#### 【0286】

本明細書で使用される場合、第2の配列に対する第1の配列のアラインメントにより、第2の配列の位置の全体でのX%以上が第1の配列によって一致することが示される場合、第1の配列は、第2の配列と「少なくともX%の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGと100%の同一性を有する配列を含むが、その理由は、アラインメントが、第2の配列の3つのすべての位置において一致があるという点で100%の同一性を与えるからである。RNAとDNAとの間の差（一般に、チミジンをウリジンに交換すること、またはその逆）、および修飾ウリジン等のヌクレオシド類似体の存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン等）が同じ相補体（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンのすべてについてのアデノシン；別の例は、シトシンおよび5-メチルシトシンであり、これらの両方が相補体としてグアノシンまたは修飾グアノシンを有する）を有する限り、ポリヌクレオチド間の同一性または相補性の差に寄与しない。したがって、例えば、Xがいずれかの修飾ウリジン、例えば、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、または5-メトキシウリジンである配列5'-AXGは、両方とも同じ配列（5'-CAU）に完全に相補的である点において、AUGと100%同一であるとみなされる。例示的なアラインメントアルゴリズムは、当該技術分野において周知である、Smith-WatermanおよびNeedleman-Wunschアルゴリズムである。当業者は、アラインメントされる配列の所与の対について、どのようなアルゴリズムおよびパラメータ設定の設定が適切であることを理解するであろう。一般的に類似する長さおよび予想される同一性がアミノ酸については50%超の配列、またはヌクレオチドについては75%超の配列に関して、www.ebi.ac.ukウェブサーバでEBIによって提供されるNeedleman-Wunschアルゴリズムインターフェースのデフォルト設定を用いたNeedleman-Wunschアルゴリズムが一般的に適切である。

#### 【0287】

「mRNA」は、RNAまたは修飾RNAであり、ポリペプチドに翻訳することができる（すなわち、リボソームおよびアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能することができる）オープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用される。mRNAは、リボース残基またはその類似体、例えば2'-メトキシリボース残基を含む、リン酸糖骨格を含むことができる。いくつかの実施形態において、核酸リン酸糖骨格の糖は、リボース残基、2'-メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。一般に、mRNAは、実質的な量のチミジン残基（例えば、0個の残基または30、20、10、5、4、3、もしくは2個未満のチミジン残基；または10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.2%、もしくは0.1%未満のチミジン含有量）を含まない。mRNAは、そのウリジン位置のいくつかまたはすべてに修飾ウリジンを含むことができる。

#### 【0288】

本明細書で使用される場合、所与のORFの「最小ウリジン含有量」は、（a）すべての位置で最小ウリジンコドンを使用し、（b）所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFのウリジン含有量である。所与のアミノ酸についての最小ウリジンコドンは、最も少ないウリジンを有するコドンである（フェニルアラニンについてのコドンを除いて、通常、0または1であり、最小ウリジンコドンは2個のウリジンを有する）。修飾ウリジン残基は、最小ウリジン含有量を評価する目的でウリジンと同等とみなされる。

#### 【0289】

本明細書で使用される場合、所与のORFの「最小ウリジンジヌクレオチド含有量」は、(a)すべての位置で最小のウリジンコドン(上述の通り)を使用し、(b)所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFの可能な最小ウリジンジヌクレオチド(UU)含有量である。ウリジンジヌクレオチド(UU)含有量は、ORF中のUUジヌクレオチドの数え上げとして、またはウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められる位置の割合として、割合に基づいて、絶対的な用語で表現することができる(例えば、AUUAUは、5個の位置のうちの2個が、ウリジンジヌクレオチドのウリジンによって占められているため、ウリジンジヌクレオチド含有量は40%である)。修飾ウリジン残基は、最小ウリジンジヌクレオチド含有量を評価する目的でウリジンと同等であるとみなされる。本明細書で使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム(ORF)の「最小アデニン含有量」は、(a)すべての位置で最小アデニンコドンを使用し、(b)所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFのアデニン含有量である。所与のアミノ酸の最小アデニンコドンは、最も少ないアデニンを有するコドンである(リジンおよびアスパラギンについてのコドンを除いて、通常0または1であり、最小アデニンコドンは2個のアデニンを有する)。修飾アデニン残基は、最小アデニン含有量を評価する目的でアデニンと同等であるとみなされる。

#### 【0290】

本明細書で使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム(ORF)の「最小アデニンジヌクレオチド含有量」は、(a)すべての位置で最小のアデニンコドン(上述の通り)を使用し、(b)所与のORFと同じアミノ酸配列をコードする、ORFの可能な最小アデニンジヌクレオチド(AA)含有量である。アデニンジヌクレオチド(AA)含有量は、ORF中のAAジヌクレオチドの数え上げとして、またはアデニンジヌクレオチドのアデニンによって占められる位置の割合として、割合に基づいて、絶対的な用語で表現することができる(例えば、UAAUAは、5個の位置のうちの2個が、アデニンジヌクレオチドのアデニンによって占められているため、アデニンジヌクレオチド含有量は40%である)。修飾アデニン残基は、最小アデニンジヌクレオチド含有量を評価する目的でアデニンと同等であるとみなされる。

#### 【0291】

本明細書で使用される場合、「TTR」は、TTR遺伝子の遺伝子産物であるトランスサイレチンを指す。

#### 【0292】

本明細書で使用される場合、「アミロイド」は、通常可溶性であるタンパク質またはペプチドの異常な凝集体を指す。アミロイドは不溶性であり、アミロイドは、臓器や組織にタンパク質性沈着物を生成し得る。アミロイド中のタンパク質またはペプチドは、タンパク質の多くのコピーが一緒に粘着して原線維を形成することを可能にする形態へとミスフォールディングされ得る。いくつかの形態のアミロイドは、人体において正常な機能を有し得るが、本明細書で使用される「アミロイド」は、タンパク質の異常な凝集体または病的な凝集体を指す。アミロイドは、TTRなどの単一のタンパク質もしくはペプチドを含み得るか、またはTTRおよび追加のタンパク質などの複数のタンパク質もしくはペプチドを含み得る。

#### 【0293】

本明細書で使用される場合、「アミロイド原線維」は、分解に耐性であるアミロイドの不溶性繊維を指す。アミロイド原線維は、特定のタンパク質またはペプチド、ならびにそれが凝集した組織および細胞型に基づいて症状を生じ得る。

#### 【0294】

本明細書で使用される場合、「アミロイドーシス」は、アミロイドまたはアミロイド原線維の沈着によって引き起こされる症状を特徴とする疾患を指す。アミロイドーシスは、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、神経系、および消化管を含む多くの臓器に影響を与える可能性がある。

#### 【0295】

本明細書で使用される場合、「ATTR」、「ATTR関連アミロイドーシス」、「ATTRアミロイドーシス」、「ATTRアミロイドーシス」、または「ATTRに関連するアミロイドーシス」は、ATTRの沈着に関連するアミロイドーシスを指す。

【0296】

本明細書で使用される場合、「家族性アミロイド心筋症」または「FAC」は、主に拘束型心筋症を特徴とする遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）を指す。FACでは、うっ血性心不全が一般的である。平均発症年齢は、およそ60～70歳であり、診断後の推定寿命は4～5年である。

【0297】

本明細書で使用される場合、「家族性アミロイドポリニューロパチー」または「FAP」は、主に感覚運動ニューロパチーを特徴とする遺伝性トランスサイレチンアミロイドーシス（ATTR）を指す。FAPでは、自律神経ニューロパチーが一般的である。ニューロパチーが主要な特徴であるが、FAPの症状には、悪液質、腎不全、および心臓病も含まれ得る。FAPの平均発症年齢は、およそ30～50歳であり、診断後の推定寿命は5～15年である。

【0298】

本明細書で使用される場合、「野生型ATTR」および「ATTRwt」は、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）などの病的なATTR変異に関連しないATTRを指す。ATTRwtは、老人性全身性アミロイドーシスとも呼ばれてきた。発症は、典型的には60歳以上の男性で発生し、最も一般的な症状は、うっ血性心不全および心房細動などの異常な心拍である。さらなる症状には、息切れ、疲労、めまい、腫脹（特に脚）、吐き気、狭心症、睡眠障害、および体重減少などの心機能不良の結果が含まれる。手根管症候群の既往は、ATTRwtのリスクの増加を示し、いくつかの場合では、早期疾患を示す可能性がある。ATTRwtは、一般に、時間の経過とともに心機能の低下を引き起こすが、野生型ATTR沈着物はよりゆっくりと蓄積するため、遺伝性ATTRよりも良好な予後を有する可能性がある。既存の治療は、他の形態のATTR（肝臓移植を除く）と類似しており、一般に、利尿薬および液体および塩分摂取の制限から抗凝固剤、および重症例では心臓移植に至るまで、心臓機能のサポートまたは改善を目的としている。それにもかかわらず、FACと同様に、ATTRwtは、診断から3～5年以内に心不全により死亡することがある。

【0299】

本明細書に記載のガイドRNA組成物および方法に有用なガイド配列を、表1および本出願全体に示す。

【0300】

本明細書で使用される場合、「遺伝性ATTR」は、ATTR遺伝子の配列における変異と関連するATTRを指す。ATTRに関連するATTR遺伝子中の既知の変異には、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）の置換を有するATTRを生じる変異が含まれる。

【0301】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、標的核酸内の二本鎖切断（DSB）の部位において挿入されるか、または欠失するかのいずれかである多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【0302】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、mRNA、またはその両方）の発現の低減を指す。タンパク質のノックダウンは、（例えば、血清または細胞培地において）組織または細胞集合体によって分泌されるタンパク質を検出することによって、または目的の組織または細胞集合体からタンパク質の全細胞量を検出することのいずれかによって、測定することができる。mRNAのノックダウンを測定する方法は既知であり、目的の組織または細胞集合体から単離されたmRNAのシーケンシングを含む。いくつかの実施形態において、「ノックダウン」は、特定の



遺伝子産物の発現のある程度の喪失、例えば、転写されるmRNAの量の低減、または細胞集合体（組織にみられるものなどのインビボ集合体を含む）によって発現または分泌されるタンパク質の量の低減を指し得る。

#### 【0303】

本明細書で使用される場合、「変異体TTR」は、TTRの野生型アミノ酸配列と比較して、TTRのアミノ酸配列に変化を有するTTR（すなわち、TTRタンパク質）の遺伝子産物を指す。ヒト野生型TTR配列は、NCBI Gene ID: 7276; Ensembl: Ensembl: ENSG00000118271で利用可能である。例えばヒトにおけるATTTRに関連するTTRの変異体形態としては、T60A、V30M、V30A、V30G、V30L、V122I、V122A、またはV122（-）が挙げられる。

10

#### 【0304】

本明細書で使用される場合、「リボ核タンパク質」（RNP）または「RNP複合体」は、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Casクリパーゼ、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9）とともに含むガイドRNAを指す。いくつかの実施形態において、ガイド配列は、Cas9などのRNAガイドDNA結合剤を標的配列へとガイドし、ガイドRNAは、標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列に結合し、その場合、この薬剤はクリパーゼまたはニッカーゼであり、結合の後に切断またはニックングを行うことができる。

20

#### 【0305】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、gRNAのガイド配列に対して相補性を有する標的遺伝子内の核酸配列を指す。標的配列とガイド配列との相互作用により、RNAガイドDNA結合剤が、標的配列内で結合し、潜在的に（薬剤の活性に応じて）ニックを形成するか、または切断するように指向される。

#### 【0306】

本明細書で使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害のための投与または治療の任意の適用を指し、その疾患を阻害すること、その進行を止めること、その疾患の1つ以上の症状を緩和すること、その疾患を治癒させること、またはその疾患の1つ以上の症状の再発を予防することを含む。例えば、ATTTRの治療は、ATTTRの症状を緩和することを含んでいてもよい。

30

#### 【0307】

本明細書で使用される場合、「病的な変異」という用語は、TTRなどの遺伝子産物が、ATTTRなどの疾患の発症を引き起こす、促進する、寄与する、または阻害することができない可能性が高い変異を指す。

#### 【0308】

本明細書で使用される場合、「脂質ナノ粒子」（LNP）という用語は、分子間力によって互いに物理的に会合する複数の（すなわち、1つより多い）脂質分子を含む粒子を指す。LNPは、例えば、ミクロスフェア（単層および多層の小胞、例えば、いくつかの実施形態において、実質的に球形であり、より特定の実施形態において、水性コアを含み得る「リポソーム」ラメラ相脂質二重層を含み、例えば、RNA分子の実質的な部分を含む）、エマルション中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相であってよい。例えば、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2017173054A1およびWO2019067992A1も参照されたい。対象にヌクレオチドを送達することが可能な当業者に公知の任意のLNPを、ガイドRNAと、本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸とともに利用され得る。

40

#### 【0309】

本明細書で使用される場合、「ドナーオリゴヌクレオチド」または「ドナーテンプレート」という用語は、標的部位（例えば、ゲノムDNAの標的部位）に挿入される所望の核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを指す。ドナーオリゴヌクレオチドは、一本鎖オリゴヌクレオチドまたは二本鎖オリゴヌクレオチドであってもよい。いくつかの実施形態におい

50

て、ドナーオリゴヌクレオチドは、LNPまたはトランスフェクションの使用を介して、ガイドRNAおよびRNAガイドDNA結合剤（例えば、Cas9）をコードする核酸配列とともに送達されてもよい。

#### 【0310】

本明細書で使用される場合、「核局在化シグナル」（NLS）または「核局在化配列」という用語は、そのような配列を含むか、またはそのような配列に連結された分子の、真核細胞の核への輸送を誘導するアミノ酸配列を指す。核局在化シグナルは、輸送される分子の一部を形成し得る。いくつかの実施形態において、NLSは、共有結合、水素結合、またはイオン相互作用によって分子の残りの部分に連結され得る。

#### 【0311】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という語句は、一般的に無毒であり、生物学的に望ましくないものではなく、薬学的使用のために他の方法では許容されるものではない、薬学的組成物を調製するのに有用であることを意味する。

#### 【0312】

本明細書で使用される場合、「注入」は、例えば、およそ30分間～12時間の注入時間での1つ以上の薬剤の能動的投与を指す。いくつかの実施形態において、1つ以上の薬剤は、例えば、本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤（例えばCas9）をコードするmRNAと、本明細書に記載のgRNAとを含むLNPを含む。

#### 【0313】

本明細書で使用される場合、「注入予防」は、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン10mgまたは等価物）、解熱剤（例えば、経口アセトアミノフェンまたはパラセタモール500mg）、静脈内H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）、および静脈内H2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）のうちの1つ以上またはすべてを含む、治療（例えば、LNPの投与を含む）前に対象に投与されるレジメンを指す。注入予防は、任意選択で、経口コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン8mgまたは等価物）の事前投与と組み合わせられる。いくつかの実施形態において、経口コルチコステロイドは、治療の8～24時間前に投与される。いくつかの実施形態において、静脈内コルチコステロイド（例えば、デキサメタゾン10mgまたは等価物）、経口アセトアミノフェン500mg、静脈内H1遮断薬（例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物）、静脈内H2遮断薬（例えば、ラニチジン50mgまたは等価物）のうちの1つ以上またはすべてが、治療の1～2時間前に投与される。いくつかの実施形態において、H1遮断薬および／またはH2遮断薬は、経口投与される。

#### 【0314】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差を意味し、これは、値がどのように測定または決定されるかに部分的に依存する。

#### 【0315】

### II. TTR遺伝子を標的とする方法および組成物

本明細書では、対象においてTTR遺伝子内の二本鎖切断（DSB）を誘導し、細胞もしくは対象においてTTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス（ATTR）を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、かつ／または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防するための方法、ならびにこのような方法で使用するための組成物を含む、関連する組成物が開示される。一般に、開示される組成物は、TTRを標的とするガイドRNAと、RNAガイドDNA結合剤（例えば、CRISPR/Cas系）をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸とを含む。このような方法および組成物で治療される対象は、野生型もしくは非野生型のTTR遺伝子配列を有していてもよく、例えば、ATTR（ATTRwt、またはATTRの遺伝性もしくは家族性の形態であってもよい）を有する対象であってもよい。

#### 【0316】

いくつかの実施形態において、組成物は、30分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、30分間の注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、60分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、90分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、120分間より長い、150分間より長い、180分間より長い、240分間より長い、300分間より長い、または360分間より長い注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、少なくとも1時間、少なくとも2時間、少なくとも4時間、少なくとも6時間、少なくとも7時間、少なくとも8時間、少なくとも9時間、少なくとも10時間、少なくとも11時間、または少なくとも12時間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、0.5～1.5時間、1.5～2.5時間、2.5～3.5時間、3.5～4.5時間、4.5～5.5時間、5.5～6.5時間、6.5～7.5時間、7.5～8.5時間、8.5～9.5時間、9.5～10.5時間、10.5～11.5時間、または11.5～12.5時間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、約240分間、約300分間、または約360分間、注入によって投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、または345～375分間、注入により投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約1.5～6時間、注入によって投与される。

10

20

【0317】

A. ガイドRNA (gRNA)

開示される方法および組成物で使用するガイドRNAは、TTR遺伝子を標的とするガイド配列を含む。TTR遺伝子を標的とする例示的なガイド配列を、表1に配列番号5～82で示す。

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : TTR 標的化ガイド配列、命名法、染色体座標、および配列

| 配列<br>番号 | ガイド I<br>D   | 説明                  | 種  | 染色体位置                                    | ガイド配列*                     |
|----------|--------------|---------------------|----|------------------------------------------|----------------------------|
| 5        | CR00<br>3335 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591917<br>-315919<br>37 | CUGCUCCUCC<br>UCUGCCUUGC   |
| 6        | CR00<br>3336 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591922<br>-315919<br>42 | CCUCCUCCUGC<br>CUUGCCUGGAC |
| 7        | CR00<br>3337 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591925<br>-315919<br>45 | CCAGUCCAGC<br>AAGGCAGAGG   |
| 8        | CR00<br>3338 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591928<br>-315919<br>48 | AUACCAGUCC<br>AGCAAGGCAG   |
| 9        | CR00<br>3339 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591934<br>-315919<br>54 | ACACAAAUAC<br>CAGUCCAGCA   |
| 10       | CR00<br>3340 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591937<br>-315919<br>57 | UGGACUGGUA<br>UUUGUGUCUG   |
| 11       | CR00<br>3341 | TTR<br>(エクソ<br>ン 1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591941<br>-315919<br>61 | CUGGUUCCUG<br>UGUCUGAGGC   |
| 12       | CR00<br>3342 | TTR<br>(エクソ<br>ン 2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592880<br>-315929<br>00 | CUUCCUACA<br>CCCAGGGCAC    |

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

|    |              |                    |    |                                          |                          |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|--------------------------|
| 13 | CR00<br>3343 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592902<br>-315929<br>22 | CAGAGGACAC<br>UUGGAUUCAC |
| 14 | CR00<br>3344 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592911<br>-315929<br>31 | UUUGACCAUC<br>AGAGGACACU |
| 15 | CR00<br>3345 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592919<br>-315929<br>39 | UCUAGAACUU<br>UGACCAUCAG |
| 16 | CR00<br>3346 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592928<br>-315929<br>48 | AAAGUUCUAG<br>AUGCUGUCCG |
| 17 | CR00<br>3347 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592948<br>-315929<br>68 | CAUUGAUGGC<br>AGGACUGCCU |
| 18 | CR00<br>3348 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592948<br>-315929<br>68 | AGGCAGUCCU<br>GCCAUCAAUG |
| 19 | CR00<br>3349 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592958<br>-315929<br>78 | UGCACGGCCA<br>CAUUGAUGGC |
| 20 | CR00<br>3350 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592962<br>-315929<br>82 | CACAUGCACG<br>GCCACAUGA  |
| 21 | CR00<br>3351 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592974<br>-315929<br>94 | AGCCUUUCUG<br>AACACAUGCA |

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

|    |              |                    |    |                                          |                          |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|--------------------------|
| 22 | CR00<br>3352 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592986<br>-315930<br>06 | GAAAGGCUGC<br>UGAUGACACC |
| 23 | CR00<br>3353 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1592987<br>-315930<br>07 | AAAGGCUGCU<br>GAUGACACCU |
| 24 | CR00<br>3354 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1593003<br>-315930<br>23 | ACCUGGGAGC<br>CAUUUGCCUC |
| 25 | CR00<br>3355 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1593007<br>-315930<br>27 | CCCAGAGGCA<br>AAUGGCUCCC |
| 26 | CR00<br>3356 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1593015<br>-315930<br>35 | GCAACUUACC<br>CAGAGGCAAA |
| 27 | CR00<br>3357 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1593022<br>-315930<br>42 | UUCUUUGGCA<br>ACUUACCCAG |
| 28 | CR00<br>3358 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595127<br>-315951<br>47 | AUGCAGCUCU<br>CCAGACUCAC |
| 29 | CR00<br>3359 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595126<br>-315951<br>46 | AGUGAGUCUG<br>GAGAGCUGCA |
| 30 | CR00<br>3360 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595127<br>-315951<br>47 | GUGAGUCUGG<br>AGAGCUGCAU |

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

|    |              |                    |    |                                          |                           |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|---------------------------|
| 31 | CR00<br>3361 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595140<br>-315951<br>60 | GCUGCAUGGG<br>CUCACAACUG  |
| 32 | CR00<br>3362 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595143<br>-315951<br>63 | GCAUGGGGCUU<br>ACAACUGAGG |
| 33 | CR00<br>3363 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595156<br>-315951<br>76 | ACUGAGGAGG<br>AAUUUGUAGA  |
| 34 | CR00<br>3364 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595157<br>-315951<br>77 | CUGAGGAGGA<br>AUUUUGUAGAA |
| 35 | CR00<br>3365 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595170<br>-315951<br>90 | UGUAGAAAGGG<br>AUACACAAAG |
| 36 | CR00<br>3366 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595193<br>-315952<br>13 | AAAUCAGACAC<br>CAAAUCCUAC |
| 37 | CR00<br>3367 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595197<br>-315952<br>17 | AGACACCAAAA<br>UCCUACUGGA |
| 38 | CR00<br>3368 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595205<br>-315952<br>25 | AAGUGCCUUC<br>CAGUAAGAUC  |
| 39 | CR00<br>3369 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595235<br>-315952<br>55 | CUCUGCAUGC<br>UCAUGGAAUG  |

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

|    |              |                    |    |                                          |                                            |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 40 | CR00<br>3370 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595236<br>-315952<br>56 | CCUCUGCAUG<br>CUC A U G G A A U            |
| 41 | CR00<br>3371 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595237<br>-315952<br>57 | A C C U C U G C A U<br>G C U C A U G G A A |
| 42 | CR00<br>3372 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1595242<br>-315952<br>62 | U A C U C A C C U C<br>U G C A U G C U C A |
| 43 | CR00<br>3373 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598570<br>-315985<br>90 | G U A U C C A C A G<br>C C A A C G A C U C |
| 44 | CR00<br>3374 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598583<br>-315986<br>03 | G C G G C G G G G G<br>C C G G A G U C G U |
| 45 | CR00<br>3375 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598592<br>-315986<br>12 | A A U G G U G U A G<br>C G G C G G G G G C |
| 46 | CR00<br>3376 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598596<br>-315986<br>16 | C G G C A A U G G U<br>G U A G C G G C G G |
| 47 | CR00<br>3377 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598597<br>-315986<br>17 | G C G G C A A U G G<br>U G U A G C G G C G |
| 48 | CR00<br>3378 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598598<br>-315986<br>18 | G G C G G C A A U G<br>G U G U A G C G G C |

10

20

30

40

50



【表 1 - 6】

|    |              |                    |    |                                          |                           |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|---------------------------|
| 49 | CR00<br>3379 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598599<br>-315986<br>19 | GGCGGGCAAU<br>GGUGUAGCGG  |
| 50 | CR00<br>3380 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598602<br>-315986<br>22 | GCAGGGCGGC<br>AAUGGUGUAG  |
| 51 | CR00<br>3381 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598610<br>-315986<br>30 | GGGGCUCAGC<br>AGGGCGGC AA |
| 52 | CR00<br>3382 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598616<br>-315986<br>36 | GGAGUAGGGG<br>CUCAGCAGGG  |
| 53 | CR00<br>3383 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598619<br>-315986<br>39 | AUAGGAGUAG<br>GGGCUCAGCA  |
| 54 | CR00<br>3384 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598620<br>-315986<br>40 | AAUAGGAGUA<br>GGGGCUCAGC  |
| 55 | CR00<br>3385 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598626<br>-315986<br>46 | CCCCUACUCC<br>UAUCCCAACA  |
| 56 | CR00<br>3386 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598629<br>-315986<br>49 | CCGUGGUGGA<br>AUAGGAGUAG  |
| 57 | CR00<br>3387 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598630<br>-315986<br>50 | GCCGUGGUGG<br>AAUAGGAGUA  |

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

|    |              |                    |    |                                          |                           |
|----|--------------|--------------------|----|------------------------------------------|---------------------------|
| 58 | CR00<br>3388 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598637<br>-315986<br>57 | GACGACAGCC<br>GUGGUGGAAU  |
| 59 | CR00<br>3389 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598643<br>-315986<br>63 | AUUGGUGACG<br>ACAGCCGUGG  |
| 60 | CR00<br>3390 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598646<br>-315986<br>66 | GGGAUUGGUG<br>ACGACAGCCG  |
| 61 | CR00<br>3391 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598647<br>-315986<br>67 | GGCUGUCGUC<br>ACCAAUCCCA  |
| 62 | CR00<br>3392 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598661<br>-315986<br>81 | AGUCCCCUUAU<br>UCCUUGGGAU |
| 63 | CR00<br>5298 | TTR<br>(エクソ<br>ン1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591883<br>-315919<br>03 | UCCACUUAUU<br>CUUGGCAGGA  |
| 64 | CR00<br>5299 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1598631<br>-315986<br>51 | AGCCGUGGUG<br>GAAUAGGAGU  |
| 65 | CR00<br>5300 | TTR<br>(エクソ<br>ン1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591967<br>-315919<br>87 | UCACAGAAAC<br>ACUCACCGUA  |
| 66 | CR00<br>5301 | TTR<br>(エクソ<br>ン1) | ヒト | c h r 18 : 3<br>1591968<br>-315919<br>88 | GUCACAGAAA<br>CACUCACCGU  |

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

|    |              |                    |            |                                          |                          |
|----|--------------|--------------------|------------|------------------------------------------|--------------------------|
| 67 | CR00<br>5302 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1592874<br>-315928<br>94 | ACGUGUCUUC<br>UCCACACCCA |
| 68 | CR00<br>5303 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1592903<br>-315929<br>23 | UGAAUCCAAG<br>UGUCCUCUGA |
| 69 | CR00<br>5304 | TTR<br>(エクソ<br>ン2) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1592969<br>-315929<br>89 | GGCCGUGCAU<br>GUGUUCAGAA |
| 70 | CR00<br>5305 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1595114<br>-315951<br>34 | UACAGGAAAA<br>CCAGUGAGUC |
| 71 | CR00<br>5306 | TTR<br>(エクソ<br>ン3) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1595204<br>-315952<br>24 | AAAUCUUACU<br>GGAAGGCACU |
| 72 | CR00<br>5307 | TTR<br>(エクソ<br>ン4) | ヒト         | c h r 18 : 3<br>1598548<br>-315985<br>68 | UGUCUGUCCU<br>CUCUCAUAGG |
| 73 | CR00<br>0689 | TTR                | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0681533<br>-506815<br>53 | ACACAAAUAC<br>CAGUCCAGCG |
| 74 | CR00<br>5364 | TTR                | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0680481<br>-506805<br>01 | AAAGGCUGCU<br>GAUGAGACCU |
| 75 | CR00<br>5365 | TTR                | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0680520<br>-506805<br>40 | CAUUGACAGC<br>AGGACUGCCU |

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

|    |              |     |            |                                          |                           |
|----|--------------|-----|------------|------------------------------------------|---------------------------|
| 76 | CR00<br>5366 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0681539<br>-506815<br>59 | AUACCAGUCC<br>AGCGAGGCAG  |
| 77 | CR00<br>5367 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0681542<br>-506815<br>62 | CCAGUCCAGC<br>GAGGCAGAGG  |
| 78 | CR00<br>5368 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0681545<br>-506815<br>65 | CCUCCUCCUGC<br>CUCGCUGGAC |
| 79 | CR00<br>5369 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0680540<br>-506805<br>60 | AAAGUCCUAG<br>AUGCCGUCCG  |
| 80 | CR00<br>5370 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0680594<br>-506806<br>14 | ACUUGUCCUCC<br>UCCUACCCCA |
| 81 | CR00<br>5371 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0678216<br>-506782<br>36 | AAGUGACUCC<br>CAGUAAAGAUU |
| 82 | CR00<br>5372 | TTR | カニク<br>イザル | c h r 18 : 5<br>0680482<br>-506805<br>02 | AAAAGGCUGC<br>UGAUGAGACC  |

10

20

## 【0318】

上述のガイド配列の各々は、c r RNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、その3'末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG（配列番号126）。s g RNAの場合、上述のガイド配列は、s g RNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、ガイド配列の3'末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。5'から3'への配向で、GUUUUAGAGCUAGAAAUA GCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU（配列番号125）。

30

## 【0319】

いくつかの実施形態において、s g RNAは、修飾されている。いくつかの実施形態において、s g RNAは、配列番号3で以下に示される修飾パターンを含み、ここで、Nが、任意の天然または非天然のヌクレオチドであり、Nの全体が、本明細書に記載されるようなガイド配列を含み、修飾s g RNAが、以下の配列：mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU（配列番号3）を含み、「N」が、任意の天然または非天然のヌクレオチドであってもよい。例えば、本明細書に包含されるのは、配列番号3であり、ここで、Nは、本明細書に開示されるガイド配列のいずれかに置き換えられる。修飾は、ガイドのヌクレオチドについてのN置換にかかわらず、配列番号3に示されるままである。すなわち、ガイドのヌクレオチドは「N」を置き換えるが、最初の3個

40

50

のヌクレオチドは、2' OMe修飾され、第1のヌクレオチドと第2のヌクレオチドとの間、第2のヌクレオチドと第3のヌクレオチドとの間、および第3のヌクレオチドと第4のヌクレオチドとの間にホスホロチオエート結合が存在する。

【0320】

いくつかの実施形態において、表2に列挙される配列のうちのいずれか1つが含まれる。

【表2-1】

表2：TTR標的化sgRNA配列

| 配列番号 | ガイドID   | 標的および説明       | 種  | 配列                                                                                                                                                                                   |
|------|---------|---------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 87   | G000480 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mA*mA*mA*GGCUGCUGA<br>UGACACCUGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 88   | G000481 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mC*mU*AGAACUUUG<br>ACCAUCAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 89   | G000482 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mG*mU*AGAAAGGAU<br>AUACAAAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

|    |             |                       |    |                                                                                                                                                                                             |
|----|-------------|-----------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 90 | G000<br>483 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mU*mC*mC*ACUCAUUCU<br>UGGCAGGAGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |
| 91 | G000<br>484 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mG*mA*CAACAAAUUC<br>UUACUGGAGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 92 | G000<br>485 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mC*mC*mU*CCUCUGCCU<br>UGCUGGACGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |
| 93 | G000<br>486 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mC*mA*CAAAUACCA<br>GUCCAGCAGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

|    |             |                       |    |                                                                                                                                                                                        |
|----|-------------|-----------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 94 | G000<br>487 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mU*mU*mC*UUUGGCAAC<br>UUACCCAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 95 | G000<br>488 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mA*mA*GUUCUAGA<br>GUGUCCGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU   |
| 96 | G000<br>489 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mU*mU*mU*GACCAUCAG<br>AGGACACUGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 97 | G000<br>490 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mA*mA*UAGACACCA<br>AAUCUUACGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

|     |             |                       |    |                                                                                                                                                                                             |
|-----|-------------|-----------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 98  | G000<br>491 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mU*mA*CCAGUCCAG<br>CAAGGCAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |
| 99  | G000<br>492 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mC*mU*mU*CUUCUACACC<br>CAGGGCACGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 100 | G000<br>493 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mA*mA*mG*UGCCUCCA<br>GUAAGAUGUUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU   |
| 101 | G000<br>494 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mG*mU*mG*AGUCUGGAG<br>AGCUGCAUGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |

10

20

30

40

50



【表 2 - 5】

|         |                  |                            |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------|------------------|----------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10<br>2 | G 0 0 0<br>4 9 5 | T T R s<br>g R N A修<br>飾配列 | ヒト | m C * m A * m G * A G G A C A C U U<br>G G A U U C A C G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 10<br>3 | G 0 0 0<br>4 9 6 | T T R s<br>g R N A修<br>飾配列 | ヒト | m G * m G * m C * C G U G C A U G U<br>G U U C A G A A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 10<br>4 | G 0 0 0<br>4 9 7 | T T R s<br>g R N A修<br>飾配列 | ヒト | m C * m U * m G * C U C C U C C U C<br>U G C C U U G C G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 10<br>5 | G 0 0 0<br>4 9 8 | T T R s<br>g R N A修<br>飾配列 | ヒト | m A * m G * m U * G A G U C U G G A<br>G A G C U G C A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

|         |                  |                             |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------|------------------|-----------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10<br>6 | G 0 0 0<br>4 9 9 | T T R s<br>g R N A 修<br>飾配列 | ヒト | mU*mG*mA*A U C C A A G U G<br>U C C U C U G A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>*mU*mU*mU |
| 10<br>7 | G 0 0 0<br>5 0 0 | T T R s<br>g R N A 修<br>飾配列 | ヒト | mC*mC*mA*G U C C A G C A A<br>G G C A G A G G G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>*mU*mU*mU |
| 10<br>8 | G 0 0 0<br>5 0 1 | T T R s<br>g R N A 修<br>飾配列 | ヒト | mU*mC*mA*C A G A A A C A C<br>U C A C C G U A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>*mU*mU*mU |
| 10<br>9 | G 0 0 0<br>5 6 7 | T T R s<br>g R N A 修<br>飾配列 | ヒト | mG*mA*mA*A G G C U G C U G<br>A U G A C A C C G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>*mU*mU*mU |

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

|         |             |                       |    |                                                                                                                                                                                       |
|---------|-------------|-----------------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11<br>0 | G000<br>568 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mG*mG*mC*UGUCGUCAC<br>CAAUCCCAGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 11<br>1 | G000<br>570 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mC*mA*mU*UGAUGGCAG<br>GACUGCCUGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 11<br>2 | G000<br>571 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mG*mU*mC*ACAGAAACA<br>CUCACCGUGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 11<br>3 | G000<br>572 | TTR s<br>gRNA修<br>飾配列 | ヒト | mC*mC*mC*CUACUCCUA<br>UUCACCCAGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAGUUAAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

|          |                  |                                                      |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------|------------------|------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 1<br>4 | G 0 0 0<br>5 0 2 | T T R カニ<br>ク イ ザ ル 特<br>異 的 s g R<br>N A 修 飾 配<br>列 | カニク<br>イザル | m A * m C * m A * C A A A U A C C A<br>G U C C A G C G G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 1 1<br>5 | G 0 0 0<br>5 0 3 | T T R カニ<br>ク イ ザ ル 特<br>異 的 s g R<br>N A 修 飾 配<br>列 | カニク<br>イザル | m A * m A * m A * A G G C U G C U G<br>A U G A G A C C G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 1 1<br>6 | G 0 0 0<br>5 0 4 | T T R カニ<br>ク イ ザ ル 特<br>異 的 s g R<br>N A 修 飾 配<br>列 | カニク<br>イザル | m A * m A * m A * G G C U G C U G A<br>U G A G A C C U G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 1 1<br>7 | G 0 0 0<br>5 0 5 | T T R カニ<br>ク イ ザ ル 特<br>異 的 s g R<br>N A 修 飾 配<br>列 | カニク<br>イザル | m C * m A * m U * U G A C A G C A G<br>G A C U G C C U G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

|         |                  |                                          |            |                                                                                                                                                                                       |
|---------|------------------|------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11<br>8 | G 0 0 0<br>5 0 6 | TTRカニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>NA修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | mA*mU*mA*CCAGUCCAG<br>CGAGGCAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 11<br>9 | G 0 0 0<br>5 0 7 | TTRカニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>NA修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | mC*mC*mA*GUCCAGCGA<br>GGCAGAGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU  |
| 12<br>0 | G 0 0 0<br>5 0 8 | TTRカニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>NA修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | mC*mC*mU*CCUCUGCCU<br>CGCUGGACGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |
| 12<br>1 | G 0 0 0<br>5 0 9 | TTRカニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>NA修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | mA*mA*mA*GUUCUAGAU<br>GCCGUCCGGUUUUAGAmG<br>mCmUmAmGmAmAmUmA<br>mGmCAAAGUUAAAUAAGG<br>CUAGUCCGUUAUCAmAmC<br>mUmUmGmAmAmAmAmG<br>mUmGmGmCmAmCmCmGmA<br>mGmUmCmGmGmUmGmCmU<br>*mU*mU*mU |

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

|          |                  |                                               |            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------|------------------|-----------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 2<br>2 | G 0 0 0<br>5 1 0 | T T R カニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>N A 修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | m A * m C * m U * U G U C U U C U C<br>U A U A C C C A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 1 2<br>3 | G 0 0 0<br>5 1 1 | T T R カニ<br>クイザル特<br>異的 s g R<br>N A 修飾配<br>列 | カニク<br>イザル | m A * m A * m G * U G A C U U C C A<br>G U A A G A U U G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |
| 1 2<br>4 | G 0 0 0<br>2 8 2 | T T R                                         | マウス        | m U * m U * m A * C A G C C A C G U<br>C U A C A G C A G U U U U A G A m G<br>m C m U m A m G m A m A m A m U m A<br>m G m C A A G U U A A A A U A A G G<br>C U A G U C C G U U A U C A m A m C<br>m U m U m G m A m A m A m A m G<br>m U m G m G m C m A m C m C m G m A<br>m G m U m C m G m G m U m G m C m U<br>* m U * m U * m U |

\* = P S 連結、 " m " = 2 ' - O - M e ヌクレオチド

## 【 0 3 2 1】

対応する s g R N A I D を有するガイド I D のアラインメントマッピング、ならびに  
カニクイザルゲノムに対する相同性およびカニクイザル適合ガイド I D を表 3 に提供する。

10

20

30

40

50

## 【表 3 - 1】

表 3 : TTR 標的化ガイド配列 ID マッピングおよびカニクイザル相同性

| 説明  | ヒトデュアルガイド ID | ヒトシングルガイド ID | カニクイザルゲノムとの不一致数   | カニクイザルの一致した d g R N A の ID | カニクイザルの一致した s g R N A の ID |
|-----|--------------|--------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| TTR | CR003<br>335 | G000<br>497  | 1                 |                            |                            |
| TTR | CR003<br>336 | G000<br>485  | 1                 | CR005<br>368               | G0005<br>08                |
| TTR | CR003<br>337 | G000<br>500  | 1                 | CR005<br>367               | G0005<br>07                |
| TTR | CR003<br>338 | G000<br>491  | 1                 | CR005<br>366               | G0005<br>06                |
| TTR | CR003<br>339 | G000<br>486  | 1                 | CR000<br>689               | G0005<br>02                |
| TTR | CR003<br>340 |              | 0                 |                            |                            |
| TTR | CR003<br>341 |              | 0                 |                            |                            |
| TTR | CR003<br>342 | G000<br>492  | カニクイザルにおいて PAM なし |                            |                            |
| TTR | CR003<br>343 | G000<br>495  | カニクイザルにおいて PAM なし |                            |                            |
| TTR | CR003<br>344 | G000<br>489  | 0                 |                            |                            |
| TTR | CR003<br>345 | G000<br>481  | 0                 |                            |                            |
| TTR | CR003<br>346 | G000<br>488  | 1                 | CR005<br>369               | G0005<br>09                |
| TTR | CR003<br>347 | G000<br>570  | 2                 | CR005<br>365               | G0005<br>05                |
| TTR | CR003<br>348 |              | 2                 |                            |                            |

10

20

30

40

50

【表 3－2】

|     |              |             |                         |              |             |
|-----|--------------|-------------|-------------------------|--------------|-------------|
| TTR | CR003<br>349 |             | >3                      |              |             |
| TTR | CR003<br>350 |             | カニクイザルに<br>おいてPAMな<br>し |              |             |
| TTR | CR003<br>351 |             | カニクイザルに<br>おいてPAMな<br>し |              |             |
| TTR | CR003<br>352 | G000<br>567 | 2                       | CR005<br>372 | G0005<br>03 |
| TTR | CR003<br>353 | G000<br>480 | 1                       | CR005<br>364 | G0005<br>04 |
| TTR | CR003<br>354 |             | 1                       |              |             |
| TTR | CR003<br>355 |             | 1                       |              |             |
| TTR | CR003<br>356 |             | 3                       |              |             |
| TTR | CR003<br>357 | G000<br>487 | >3                      |              |             |
| TTR | CR003<br>358 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>359 | G000<br>498 | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>360 | G000<br>494 | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>361 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>362 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>363 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>364 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>365 | G000<br>482 | 0                       |              |             |

10

20

30

40

50



【表 3 - 3】

|     |              |             |                         |              |             |
|-----|--------------|-------------|-------------------------|--------------|-------------|
| TTR | CR003<br>366 | G000<br>490 | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>367 | G000<br>484 | カニクイザルに<br>おいてPAMな<br>し |              |             |
| TTR | CR003<br>368 | G000<br>493 | 1                       | CR005<br>371 | G0005<br>11 |
| TTR | CR003<br>369 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>370 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>371 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>372 |             | 0                       |              |             |
| TTR | CR003<br>373 |             | 1                       |              |             |
| TTR | CR003<br>374 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>375 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>376 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>377 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>378 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>379 |             | 2                       |              |             |
| TTR | CR003<br>380 |             | 1                       |              |             |
| TTR | CR003<br>381 |             | 1                       |              |             |
| TTR | CR003<br>382 |             | 0                       |              |             |

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

|     |              |             |                     |              |             |
|-----|--------------|-------------|---------------------|--------------|-------------|
| TTR | CR003<br>383 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>384 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>385 | G000<br>572 | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>386 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>387 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>388 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>389 | G000<br>569 | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>390 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>391 | G000<br>568 | 0                   |              |             |
| TTR | CR003<br>392 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR005<br>298 | G000<br>483 | 1                   |              |             |
| TTR | CR005<br>299 |             | 0                   |              |             |
| TTR | CR005<br>300 | G000<br>501 | カニクイザルに<br>おいてPAMなし |              |             |
| TTR | CR005<br>301 | G000<br>571 | 0                   |              |             |
| TTR | CR005<br>302 |             | 2                   | CR005<br>370 | G0005<br>10 |
| TTR | CR005<br>303 | G000<br>499 | 0                   |              |             |
| TTR | CR005<br>304 | G000<br>496 | > 3                 |              |             |

10

20

30

【表 3 - 5】

|     |              |  |   |  |  |
|-----|--------------|--|---|--|--|
| TTR | CR005<br>305 |  | 0 |  |  |
| TTR | CR005<br>306 |  | 1 |  |  |
| TTR | CR005<br>307 |  | 0 |  |  |

40

## 【0322】

いくつかの実施形態において、gRNAは、ヌクレアーゼ（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼ）であってもよいRNAガイドDNA結合剤を、TTR中の標的DNA配列に指向させるガイド配列を含む。gRNAは、表1に示されるガイド配列を含むcrRNAを含み得る。gRNAは、表1に示されるガイド配列の17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含むcrRNAを含み得る。いくつかの実施形態において、gRNAは、表1に示されるガイド配列の少なくとも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドに対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%

50

、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。いくつかの実施形態において、gRNAは、表1に示されるガイド配列に対して約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有する配列を含むcrRNAを含む。gRNAは、trRNAをさらに含み得る。本明細書に記載される各々の組成物および方法の実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、シングルRNA (sgRNA) として会合していてもよく、または別個のRNA上にあってもよい (dgRNA)。sgRNAの文脈において、crRNAおよびtrRNAの構成要素は、例えば、ホスホジエステル結合または他の共有結合を介して共有結合され得る。

#### 【0323】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態において、ガイドRNAは、「デュアルガイドRNA」または「dgRNA」として2つのRNA分子を含み得る。dgRNAは、例えば、表1に示されるガイド配列を含むcrRNAを含む第1のRNA分子と、trRNAを含む第2のRNA分子と、を含む。第1のRNA分子と第2のRNA分子は共有結合していなくてもよいが、crRNAとtrRNAの部分の間の塩基対形成によってRNA二本鎖を形成してもよい。

#### 【0324】

本明細書に記載される各々の組成物、使用および方法の実施形態において、ガイドRNAは、「シングルガイドRNA」または「sgRNA」としてシングルRNA分子を含み得る。sgRNAは、trRNAに共有結合した表1に示されるガイド配列を含むcrRNA (またはその一部) を含み得る。sgRNAは、表1に示されるガイド配列のも17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、リンカーを介して共有結合される。いくつかの実施形態において、sgRNAは、crRNAとtrRNAの部分の間の塩基対形成によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、ホスホジエステル結合ではない1つ以上の結合を介して共有結合される。

#### 【0325】

いくつかの実施形態において、trRNAは、天然に存在するCRISPR/Cas系由来のtrRNA配列のすべてまたは一部を含み得る。いくつかの実施形態において、trRNAは、先端切断または修飾された野生型trRNAを含む。trRNAの長さは、使用されるCRISPR/Cas系に依存する。いくつかの実施形態において、trRNAは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または100個より多いヌクレオチドを含むか、またはそれからなる。いくつかの実施形態において、trRNAは、例えば1つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造などの特定の二次構造を含み得る。

#### 【0326】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～82から選択されるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNAを含む。

#### 【0327】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を含むgRNAを含む。

#### 【0328】

いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む1つ以上のガイドRNAを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるガイド配列を含むgRNAを含む。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択される配列は

10

20

30

40

50

、配列番号 5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または 69 である。いくつかの実施形態において、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列は、配列番号 5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または 69 である。特に、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列を含むガイド RNA は、sgRNA であり得る。配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列を含むガイド RNA は、化学修飾 sgRNA、例えば、末端修飾 RNA であり得る。配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列を含むガイド RNA は、dgRNA、例えば、化学修飾 dgRNA であり得る。

10

#### 【0329】

他の実施形態において、組成物は、配列番号 5～82 のガイド配列のうちのいずれか 2 つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも 1 つ、例えば、少なくとも 2 つの gRNA を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号 5～82 の核酸のうちのいずれかに対して少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一であるガイド配列を各々含む少なくとも 2 つの gRNA を含む。

#### 【0330】

他の実施形態において、組成物は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択されるガイド配列のうちのいずれか 2 つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも 1 つ、例えば、少なくとも 2 つの gRNA を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列のいずれかと少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一であるガイド配列を各々含む少なくとも 2 つの gRNA を含む。いくつかの実施形態において、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列は、配列番号 5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または 69 から選択される 1 つの配列、または 2 つの配列を含む。いくつかの実施形態において、配列番号 5～72、74～78、および 80～82 から選択される配列は、配列番号 5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または 69 から選択される 1 つの配列、または 2 つの配列を含む。

20

30

#### 【0331】

いくつかの実施形態において、gRNA は、表 2 に示される配列（配列番号 87～124）のいずれか 1 つを含む sgRNA である。いくつかの実施形態において、gRNA は、表 2 に示される配列（配列番号 87～124）のいずれか 1 つを含むが、示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号 87～124）sgRNA である。いくつかの実施形態において、sgRNA は、配列番号 87～124 の核酸のいずれかと少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNA は、配列番号 87～124 の核酸のいずれかと少なくとも 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または 90% 同一であるが、示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号 87～124）配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNA は、修飾の有無にかかわらず、配列番号 87～124 で表 2 の sgRNA 配列に示されるガイド配列の代わりに、表 1 に示されるガイド配列のいずれか 1 つを含む。

40

#### 【0332】

いくつかの実施形態において、gRNA は、配列番号 87～113、115～120、または 122～124 のいずれか 1 つを含む sgRNA である。いくつかの実施形態において、gRNA は、配列番号 87～113、115～120、または 122～124 のい

50

いずれか1つを含むが、表2に示される修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～113、115～120、または122～124）sgRNAである。いくつかの実施形態において、gRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124のうちのいずれか1つを含むが、少なくとも1つの化学修飾を有し、表2に示される修飾パターンを含まない（すなわち、化学修飾された配列番号87～113、115～120、または122～124）sgRNAである。化学修飾されたガイドRNAは、表2に示されるような修飾のうちの1つ以上を含んでもよい。いくつかの実施形態において、表2に示される修飾パターンを含まない化学修飾された配列番号87～113、115～120、または122～124は、5' および／または3' 末端修飾を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号87～113、115～120、または122～124の核酸のいずれかと少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一であるが、示されるような修飾を含まない（すなわち、非修飾配列番号87～113、115～120、または122～124）配列を含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、修飾の有無にかかわらず、配列番号87～113、115～120、または122～124における表2のsgRNA配列に示されるガイド配列の代わりに、表1に示されるガイド配列のうちのいずれか1つを含む。

【0333】

本明細書に提供されるガイドRNAは、TTR遺伝子内の標的配列を認識する（例えば、それにハイブリダイズする）ために有用であり得る。例えば、TTR標的配列は、ガイドRNAを含む提供されるCasクリパーゼによって認識され、切断され得る。したがって、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、ガイドRNAをTTR遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイドRNAのガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、RNAガイドDNA結合剤、例えば、Casクリパーゼは、標的配列を切断する。

【0334】

いくつかの実施形態において、1つ以上のガイドRNAの選択は、TTR遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。

【0335】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性DSBの結果として生じるインデルに起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、DSBの位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態において、TTR内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するgRNAは、RNAガイドDNA結合剤をTTR遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態において、gRNAは、TTRのエクソン1、エクソン2、エクソン3、またはエクソン4内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するガイド配列を有するように設計されている。

【0336】

#### B. gRNAの修飾

いくつかの実施形態において、gRNAは、化学修飾されている。1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むgRNAは、標準的なA、G、C、およびU残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される1つ以上の非天然および／または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」gRNAまたは「化学修飾」gRNAと呼ばれる。いくつかの実施形態において、修飾gRNAは、非標準的なヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、(i) ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の1つもしくは両方、および／または、架橋リン酸酸素の1つ以

10

20

30

40

50

上の置き換え（例示的な骨格修飾）、（i i）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（i i i）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（i v）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、（v）リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、（v i）オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような3'または5'のキャップ修飾は、糖および／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに（v i i）糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の1つ以上を含み得る。上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせ、2、3、4、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシドおよびヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾gRNAを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態において、gRNAの各々の塩基は修飾され、例えば、すべての塩基がホスホロチオエート基などの修飾リン酸基を有する。特定の実施形態において、gRNA分子のリン酸基のすべて、または実質的にすべてがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態において、修飾gRNAは、RNAの5'末端において、またはその近傍において少なくとも1つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾gRNAは、RNAの3'末端において、またはその近傍において少なくとも1つの修飾残基を含む。

#### 【0337】

いくつかの実施形態において、gRNAは、1、2、3、またはそれ以上の修飾残基を含む。いくつかの実施形態において、修飾gRNA内の位置の少なくとも5%（例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%）が、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

#### 【0338】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中にみられるものによる分解を受けやすい場合がある。例えば、ヌクレアーゼは核酸のホスホジエステル結合を加水分解し得る。したがって、一態様において、本明細書に記載されるgRNAは、例えば、細胞内または血清に由来するヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、1つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される修飾gRNA分子は、インビボとエクスピボの両方において細胞集合体に導入されるとき、低減した自然免疫応答を示し得る。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン（特にインターフェロン）発現および放出の誘導および細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外来性核酸に対する細胞応答を含む。

#### 【0339】

骨格修飾のいくつかの実施形態において、修飾残基のリン酸基は、1つ以上の酸素を異なる置換基によって置き換えることによって修飾され得る。さらに、修飾残基、例えば修飾核酸中に存在する修飾残基は、本明細書において記載されるように、非修飾リン酸部分の修飾リン酸基による大規模な置き換えを含み得る。いくつかの実施形態において、リン酸骨格の骨格修飾は、帯電していないリンカーまたは非対称な電荷分布を有する帯電したリンカーのいずれかをもたらす改変を含み得る。

#### 【0340】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリアルホスホネート、およびホスホトリエステルを含む。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの1つの、上述の原子または原子群のうちの1つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「R

10

20

30

40

50

」配置（本明細書においてR p）または「S」配置（本明細書においてS p）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

#### 【0341】

リン酸基は、ある骨格修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリinker、スフホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（methylenehydrazo）、メチレンジメチルヒドラゾ（methylenedimethylhydrazo）、メチレンオキシメチルイミノ（methyleneoxymethylimino）を含み得る。リン酸リンカーとリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている核酸を模倣できるスキャフォールドもまた構築できる。そのような修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（PNA）ヌクレオシド代替物を含み得る。

#### 【0342】

修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖に対する1つ以上の修飾、すなわち糖修飾を含み得る。例えば、2'ヒドロキシル基（OH）は、修飾されていてもよく、例えば、多くの異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基に対する修飾は、ヒドロキシルが2'-アルコキシドイオンを形成するようにさらに脱プロトン化されることがもはや起こり得ないので、核酸の安定性を増強し得る。

#### 【0343】

2'ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリアルオキシ（OR、式中「R」がアルキル、シクロアルキル、アリアル、アラキル、ヘテロアリアル、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（PEG）、 $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ であって式中Rが、例えば、Hまたは任意選択で置換されたアルキルであり、nが0~20の整数であり得るもの（例えば、0~4、0~8、0~10、0~16、1~4、1~8、1~10、1~16、1~20、2~4、2~8、2~10、2~16、2~20、4~8、4~10、4~16、および4~20）を含み得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、2'-O-Meであり得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、2'-ヒドロキシル基をフッ素で置き換える2'-フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、2'ヒドロキシルが、例えばC<sub>1-6</sub>アルキレンまたはC<sub>1-6</sub>ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の4'炭素へと接続し得る「ロックド」核酸（LNA）を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、O-アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH<sub>2</sub>、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、もしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、およびアミノアルコキシ、 $O(CH_2)_n$ -アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH<sub>2</sub>、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、もしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、リボース環がC2'-C3'結合を欠失している「アンロックド（unlocked）」核酸（UNA）を含み得る。いくつかの実施形態において、2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（

MOE)、 $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)$ 、例えばPEG誘導体)を含み得る。

【0344】

「デオキシ」2'修飾は、水素(すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的なdsRNAの突出部分)、ハロ(例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード)、アミノ(ここでアミノは、例えば、 $\text{NH}_2$ 、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る)、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -アミノ(ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである)、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (ここでRは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る)、シアノ、メルカプト、アルキルチオ-アルキル、チオアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

糖修飾は、1つ以上の炭素を含み、リボースにおける対応する炭素のものとは反対の立体化学配置を有する糖基を含み得る。したがって、修飾核酸は、糖として例えばアラビノースを含むヌクレオチドを含み得る。修飾核酸はまた、脱塩基糖をも含み得る。これらの脱塩基糖はまた、構成要素の糖原子の1つ以上においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、L型である1つ以上の糖、例えばL-ヌクレオシドを含み得る。

【0345】

修飾核酸に組み込むことのできる本明細書において記載される修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、核酸塩基とも呼ばれる修飾塩基を含み得る。核酸塩基の例は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、およびウラシル(U)を含むが、これらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾されて、または完全に置き換えられて、修飾核酸に組み込むことのできる修飾残基をもたらすことができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、独立して、プリン、ピリミジン、プリン類似体、またはピリミジン類似体から選択することができる。いくつかの実施形態において、核酸塩基は、例えば、天然に存在する塩基、および塩基の合成誘導体を含み得る。

デュアルガイドRNAを用いる実施形態において、crRNAとtracrRNAの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、crRNAおよび/またはtracrRNAの一方または両方の末端に存在してもよい。sgRNAを含む実施形態において、sgRNAの一方または両方の末端における1つ以上の残基は、化学修飾されていてもよく、またはsgRNA全体が化学修飾されていてもよい。特定の実施形態は、5'末端修飾を含む。特定の実施形態は、3'末端修飾を含む。特定の実施形態において、ガイドRNA分子の一本鎖突出におけるヌクレオチドの1つ以上またはそのすべては、デオキシヌクレオチドである。

【0346】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるガイドRNAは、2016年12月8日に出版された「Chemically Modified Guide RNAs」という発明の名称のUS62/431,756に開示された修飾パターンの1つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

いくつかの実施形態において、本発明は、1つ以上の修飾を含むgRNAを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、修飾は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)結合を含む。

【0347】

「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」という用語は、2'-O-Meによって修飾されているヌクレオチドを表すために使用され得る。

【0348】

2'-O-メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

10

20

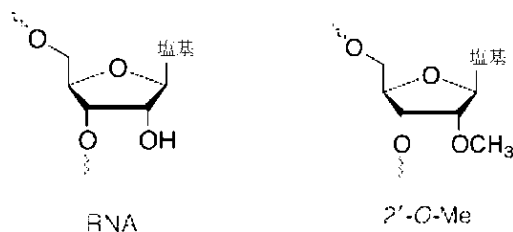
30

40

50



## 【化 1】



## 【0349】

10

ヌクレオチド糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾は、ハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチド糖環上の2'-フルオロ(2'-F)置換は、オリゴヌクレオチド結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

## 【0350】

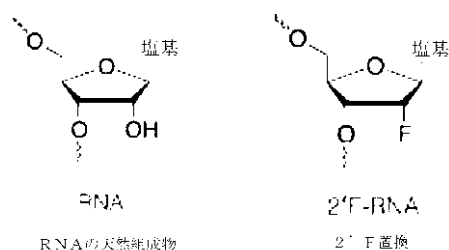
本出願において、「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」という用語は、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

## 【0351】

2'-Fの置換は、以下のように描写され得る。

## 【化 2】

20



## 【0352】

ホスホロチオエート(P S)連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での1個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはS-オリゴとも称され得る。

30

## 【0353】

P S修飾を示すために、「\*」を使用し得る。本出願では、用語A\*、C\*、U\*、またはG\*を使用して、P S結合で隣りの(例えば3')ヌクレオチドに結合されているヌクレオチドを示すことができる。

## 【0354】

本出願では、用語「mA\*」、「mC\*」、「mU\*」、または「mG\*」を使用して、2'-O-Meで置換され、P S結合で次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。

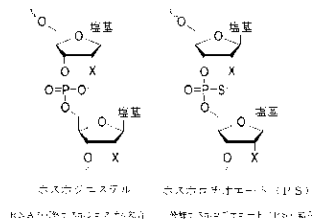
40

## 【0355】

以下の図は、非架橋リン酸酸素へのS-の置換を示し、ホスホジエステル結合の代わりにP S結合を生じる。

50

## 【化 3】

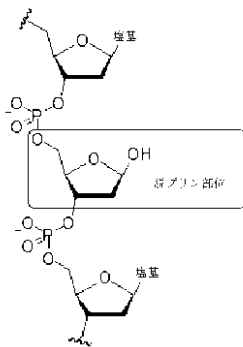


## 【0356】

10

脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。

## 【化 4】

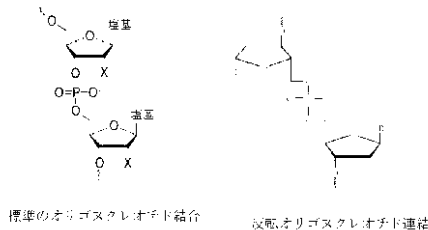


20

## 【0357】

反転した塩基は、通常の 5' から 3' への連結とは反転した連結を有するものを指す（すなわち、5' から 5' への連結または 3' から 3' への連結のいずれか）。例えば、

## 【化 5】



30

## 【0358】

脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結と接続することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、5' から 5' 結合を介して末端 5' ヌクレオチドに結合してもよいし、または脱塩基ヌクレオチドは、3' から 3' 結合を介して末端 3' ヌクレオチドに結合してもよい。末端 5' または 3' ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。

40

## 【0359】

いくつかの実施形態において、5' 末端部における最初の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上、および 3' 末端部における最後の 3、4、または 5 個のヌクレオチドのうちの 1 つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態において、修飾は、2'-O-Me、2'-F、反転した脱塩基ヌクレオチド、P=S 結合、または安定性および／または性能を増加させることが当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

## 【0360】

いくつかの実施形態において、5' 末端部における最初の 4 個のヌクレオチド、および 3'

50

’末端部における最後の4個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（PS）結合を用いて連結される。

【0361】

いくつかの実施形態において、5’末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3’末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2’-O-メチル（2’-O-Me）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、5’末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3’末端部における最後の3個のヌクレオチドは、2’-フルオロ（2’-F）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、5’末端部における最初の3個のヌクレオチド、および3’末端部における最後の3個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

10

【0362】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、修飾sgRNAを含む。いくつかの実施形態において、sgRNAは、配列番号3に示される修飾パターンを含み、Nが、任意の天然もしくは非天然のヌクレオチドであり、Nの全体が、標的配列にヌクレアーゼを指向させるガイド配列を含む。

【0363】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号87～124のうちのいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号125のヌクレオチドと、を含むsgRNAを含み、配列番号125のヌクレオチドが、ガイド配列の3’末端にあり、ガイド配列は、配列番号3に示されるように修飾され得る。

20

【0364】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列と、配列番号125のヌクレオチドと、を含むsgRNAを含み、配列番号125のヌクレオチドが、ガイド配列の3’末端にあり、ガイド配列は、配列番号3に示されるように修飾され得る。

【0365】

C. RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸

本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤（例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードするORFを含む核酸を、本明細書に開示されるgRNAのいずれかを用いる組成物または方法に組み合わせてもよい。本明細書に記載の実施形態のいずれかにおいて、RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸は、mRNAであり得る。

30

【0366】

1. 低アデニン含有量のORF

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤、例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼをコードするORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の約150%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニン含有量は、その最小アデニン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約150%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約145%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約140%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約135%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量の約130%以下である。いくつかの実施形

40

50

10

## 20

30

40

50

、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約120%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約115%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約110%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約105%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約104%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約103%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約102%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量の約101%以下である。

10

#### 【0368】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニンジヌクレオチド含有量の90%以下であるアデニンジヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニンジヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニンジヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

20

#### 【0369】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が、0個のアデニントリヌクレオチドから、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または50個のアデニントリヌクレオチドまでの範囲である（さらに長い数のアデニンは、その中の固有の3個のアデニンセグメントの数として計数する、例えば、アデニンテトラヌクレオチドは、2個のアデニントリヌクレオチドを含有し、アデニンペンタヌクレオチドは、3個のアデニントリヌクレオチドを含有するなど）。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が、0%のアデニントリヌクレオチドから、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、または2%のアデニントリヌクレオチドまでの範囲であり、アデニントリヌクレオチドの含有パーセントは、アデニントリヌクレオチド（またはさらに長い数のアデニン）の一部を形成するアデニンによって占められる配列中の位置のパーセントとして計算され、その結果、配列UUUAAAおよびUUUAAAは、各々、アデニントリヌクレオチド含有量が50%である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が2%以下である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が1.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.9%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.8%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.7%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.6%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.4%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.3%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.2%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が0.1%以下である。いくつかの実施形態において、アデニントリヌクレオチド

30

40

50

を含まないORFを含むRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸が提供される。

### 【0370】

いくつかの実施形態において、ORFは、アデニントリヌクレオチド含有量が、その最小アデニントリヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニントリヌクレオチド含有量の90%以下であるアデニントリヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのアデニントリヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大アデニントリヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

10

### 【0371】

例えば、ORFの十分な画分において最小アデニンコドンを使用することによって、所与のORFは、アデニン含有量またはアデニンジヌクレオチド含有量またはアデニントリヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ、ORFの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小アデニンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表4に列挙されるコドンである。

20

### 【表4】

表4. 例示的な最小アデニンコドン

|   | アミノ酸     | 最小アデニンコドン       |
|---|----------|-----------------|
| A | アラニン     | GCUまたはGCCまたはGCG |
| G | グリシン     | GGUまたはGGCまたはGGG |
| V | バリン      | GUCまたはGUUまたはGUG |
| D | アスパラギン酸  | GACまたはGAU       |
| E | グルタミン酸   | GAG             |
| I | イソロイシン   | AUCまたはAUU       |
| T | スレオニン    | ACUまたはACCまたはACG |
| N | アスパラギン   | AACまたはAAU       |
| K | リジン      | AAG             |
| S | セリン      | UCUまたはUCCまたはUCG |
| R | アルギニン    | CGUまたはCGCまたはCGG |
| L | ロイシン     | CUGまたはCUCまたはCUU |
| P | プロリン     | CCGまたはCCUまたはCCC |
| H | ヒスチジン    | CACまたはCAU       |
| Q | グルタミン    | CAG             |
| F | フェニルアラニン | UUCまたはUUU       |
| Y | チロシン     | UACまたはUAU       |
| C | システイン    | UGCまたはUGU       |
| W | トリプトファン  | UGG             |
| M | メチオニン    | AUG             |

30

40

### 【0372】

いくつかの実施形態において、コドンの少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が表4に列挙されるコドンであるコドンのセットからなるORFを含む、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードする核酸が提供される。いくつかの実施形態において、ORFは、最小ヌクレオチドホモポリマー、例えば、同じヌクレオチドの反復ストリングを有する。例えば、いくつかの実施形態において、表4

50

に列挙されるコドンから最小ウリジンコドンを選択するとき、核酸は、ヌクレオチドホモポリマーの数および長さを減少させる最小アデニンコドンを選択すること、例えば、アラニンについて G C C の代わりに G C G を選択すること、またはグリシンについて G G G の代わりに G G C を選択することによって構築される。

【0373】

前述の実施形態のいずれにおいても、核酸は、mRNAであり得る。

【0374】

2. 翻訳を増加させ、および／または高発現 tRNA に対応するコドン、例示的なコドンセット

いくつかの実施形態において、核酸は、ヒトなどの哺乳動物における翻訳を増加させるコドンを有する ORF を含む。さらなる実施形態において、核酸は、哺乳動物（例えば、ヒト）の臓器（例えば肝臓）における翻訳を増加させるコドンを有する ORF を含む。さらなる実施形態において、核酸は、哺乳動物（例えば、ヒト）の細胞型（例えば肝細胞）における翻訳を増加させるコドンを有する ORF を含む。哺乳動物、細胞型、哺乳動物の臓器、ヒト、ヒトの臓器などにおける翻訳の増加は、ORF の野生型配列の翻訳の程度と比較して、または ORF の由来となる生物もしくはアミノ酸レベルで最も良く似た ORF を含有する生物（例えば、*S. pyogenes*、*S. aureus*、または原核生物に由来する Cas ヌクレアーゼであり得る場合には、別の原核生物、例えば、他の以下に記載の原核生物由来の Cas ヌクレアーゼ）のコドン分布と一致するコドン分布を有する ORF と比較して、決定することができる。あるいは、いくつかの実施形態において、哺乳動物、細胞型、哺乳動物の臓器、ヒト、ヒトの臓器などにおける Cas 9 配列の翻訳の増加は、任意の適用可能な点変異、異種ドメインなどを含む、他がすべて等しい配列番号 205 の配列を有する ORF の翻訳と比較して決定される。ヒト肝臓およびヒト肝細胞を含むヒトにおける発現を増加させるのに有用なコドンは、ヒト肝臓／肝細胞における高発現 tRNA に対応するコドンであってもよく、これらは Dittmar KA, PLoS Genetics 2 (12): e221 (2006) に記載されている。いくつかの実施形態において、ORF 中のコドンの少なくとも約 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% は、ヒトなどの哺乳動物における高発現 tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現 tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF 中のコドンの少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% は、ヒト臓器などの哺乳動物臓器における高発現 tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現 tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF 中のコドンの少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% は、ヒト肝臓などの哺乳動物肝臓における高発現 tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現 tRNA）に対応するコドンである。いくつかの実施形態において、ORF 中のコドンの少なくとも 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% は、ヒト肝細胞などの哺乳動物肝細胞における高発現 tRNA（例えば、各アミノ酸についての最高発現 tRNA）に対応するコドンである。

【0375】

あるいは、生物（例えば、ヒト）における高発現 tRNA に対応するコドンを一般に使用してもよい。

【0376】

コドン選択に対する前述のアプローチのうちのいずれかは、例えば、表 4 のコドンから開始し、次いで、1 つより多い選択肢が利用可能な場合、一般に生物（例えば、ヒト）において、または目的の臓器または細胞型、例えば、肝臓または肝細胞（例えば、ヒトの肝臓またはヒトの肝細胞）のいずれかにおいて、より高発現の tRNA に対応するコドンを使用することによって、上に示される最小アデニンコドンと組み合わせることができる。

【0377】

いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示されるコドンセット（例えば、低U、低A、または低A/Uコドンセット）由来のコドンである。低Aおよび低A/Uセット中のコドンは、1つより多い選択肢が利用可能な場合、より高発現のtRNAに対応するコドンも使用しつつ、示されるヌクレオチドを最小限にするコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低Uコドンセット由来のコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低Aコドンセット由来のコドンである。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%は、表5に示される低A/Uコドンセット由来のコドンである。

【表5】

表5. 例示的なコドンセット

| アミノ酸  | 低U  | 低A  | 低A/U |
|-------|-----|-----|------|
| G l y | GGC | GGC | GGC  |
| G l u | GAG | GAG | GAG  |
| A s p | GAC | GAC | GAC  |
| V a l | GTG | GTG | GTG  |
| A l a | GCC | GCC | GCC  |
| A r g | AGA | CGG | CGG  |
| S e r | AGC | TCC | AGC  |
| L y s | AAG | AAG | AAG  |
| A s n | AAC | AAC | AAC  |
| M e t | ATG | ATG | ATG  |
| I l e | ATC | ATC | ATC  |
| T h r | ACC | ACC | ACC  |
| T r p | TGG | TGG | TGG  |
| C y s | TGC | TGC | TGC  |
| T y r | TAC | TAC | TAC  |
| L e u | CTG | CTG | CTG  |
| P h e | TTC | TTC | TTC  |
| G l n | CAG | CAG | CAG  |
| H i s | CAC | CAC | CAC  |

## 【0378】

## 3. 例示的な配列

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFは、配列番号311と少なくとも93%の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいはORFは、少なくともその最初の50、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって



配列番号 311 と少なくとも 93 % の同一性を有するか、または少なくともその最初の 30、50、70、100、150、200、250、もしくは 300 のヌクレオチドにわたって配列番号 311 と少なくとも 95 % の同一性を有し、かつ／あるいは ORF は、コドンの少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、もしくは 100 % が表 4 もしくは 5 に列挙されるコドンであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは ORF は、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 123 % までの範囲であり、かつ／あるいは ORF は、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 150 % までの範囲である。

【0379】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF は、配列番号 377 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、または 100 % の同一性を有する配列を含む。

【0380】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF は、配列番号 311～313、328、329、346～348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態において、mRNA は、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含み、RNA ガイド DNA 結合剤は、配列番号 203、213、268、もしくは 386～396 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ORF は、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 150 % までの範囲であり、かつ／あるいは アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 150 % までの範囲である。いくつかの実施形態において、コードされた RNA ガイド DNA 結合剤は、配列番号 203、213、268、もしくは 386～396 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ORF は、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の 150 % までの範囲であり、かつ／あるいは ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量～その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の 150 % までの範囲である。いくつかのこのような実施形態において、アデニンおよびウリジンヌクレオチド含有量の両方は、それぞれの最小値の 150 % 以下である。いくつかの実施形態において、アデニンおよびウリジンジヌクレオチド含有量の両方は、それぞれの最小値の 150 % 以下である。いくつかの実施形態において、前述の同一性レベルのいずれかは、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % である。

【0381】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF は、少なくともその最初の 30、50、70、100、150、200、250、もしくは 300 のヌクレオチドにわたって配列番号 311～313、328、329、346～348、355、356、363、または 364 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有する。その最初の 30、50、70、100、150、200、250、もしくは 300 のヌクレオチドは、開始コドンの最初のヌクレオチド（典型的には、ATG）から測定され、その結果、A がヌクレオチド 1 であり、T がヌクレオチド 2 である、などである。いくつかの実施形態において、オープンリーディングフレームは、その配列の少なくともその最初の 10 %、12 %、15 %、20 %、25 %、30 %、または 35 % にわたって配列番号 311～313、328、329、346～348、355、356、363、または 364 のいずれか 1 つと少なくとも 90 % の同一性を有する。ORF の配列の長さは、開始コドンの始まりから終止コドンの最後までヌクレオチドの数であり、その配列の最初の 10 %、12 %、15 %、20 %、25 %、30 %、または 35 % は、全配列の長さの所定のパーセンテージを構成する開始コドンの最初のヌクレオチドから始まるヌクレオチドの数に対応する。

10

20

30

40

50

## 【0382】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号243と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号243のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

## 【0383】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号244と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号244のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

10

## 【0384】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号256と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号256のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

## 【0385】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号257と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号257のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

20

## 【0386】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号258と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号258のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

30

## 【0387】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号259と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号259のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

## 【0388】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号260と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号260のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

40

## 【0389】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、配列番号261と少なくとも90%の同一性を有し、配列番号261のORF（すなわち、配列番号204）が、配列番号311～313、328、329、346～348、355、356、363、または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

## 【0390】

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核

50

酸は、配列番号 376 と少なくとも 90% の同一性を有し、任意選択で、配列番号 376 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの代替 ORF と置換されている、配列を含む。

【0391】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 377 と少なくとも 90% の同一性を有し、任意選択で、配列番号 377 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの代替 ORF と置換されている、配列を含む。

10

【0392】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 378 と少なくとも 90% の同一性を有し、任意選択で、配列番号 378 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの代替 ORF と置換されている、配列を含む。

【0393】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 379 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 379 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

20

【0394】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 380 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 380 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

【0395】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 381 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 381 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

30

【0396】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 382 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 382 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

【0397】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 383 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 383 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

40

【0398】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 384 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 384 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、または 364 のうちのいずれか 1 つの ORF と置換されている、配列を含む。

【0399】

いくつかの実施形態において、RNA ガイド DNA 結合剤をコードする ORF を含む核酸は、配列番号 385 と少なくとも 90% の同一性を有し、配列番号 385 の ORF が、配列番号 311 ~ 313、328、329、346 ~ 348、355、356、363、

50

または364のうちのいずれか1つのORFと置換されている、配列を含む。

【0400】

いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～261、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも95%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～261、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも98%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～261、または176～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、少なくとも99%である。いくつかの実施形態において、配列番号243、244、256～261、または376～385の任意選択で置換された配列との同一性の程度は、100%である。

10

【0401】

#### 4. 核酸、mRNA、およびORFの追加の特徴

本明細書に記載の追加の特徴のいずれも、実現可能な範囲で、上述の実施形態のいずれかと組み合わせられ得る。

【0402】

##### a) 低ウリジン含有量

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードするORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の約150%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジン含有量は、その最小ウリジン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量に等しい。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約150%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約145%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約140%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約135%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約130%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約125%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約120%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約115%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約110%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約105%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約104%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約103%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約102%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量の約101%以下である。

20

30

40

【0403】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジンジヌクレオチド含有量が、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量～その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の200%の範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジンジヌクレオチド含有量は、その最小ウリジンジヌクレオチド含有量の約195%以下、190%以下、185%以下、180%以下、175%以下、170%以下、165%以下、160%以下、155%以下、150%以下、145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、1

50

40

50

以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0405】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0個のウリジントリヌクレオチドから、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、または50個のウリジントリヌクレオチドまでの範囲である（さらに長い数のウリジンは、その中の固有の3個のウリジンセグメントの数として計数する、例えば、ウリジントetraヌクレオチドは、2個のウリジントリヌクレオチドを含有し、ウリジンpentaヌクレオチドは、3個のウリジントリヌクレオチドを含有するなど）。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0%のウリジントリヌクレオチドから、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、1.5%、または2%のウリジントリヌクレオチドまでの範囲であり、ウリジントリヌクレオチドの含有パーセントは、ウリジントリヌクレオチド（またはさらに長い数のウリジン）の一部を形成するウリジンによって占められる配列中の位置のパーセントとして計算され、その結果、配列UUUAAAおよびUUUAAAは、各々のウリジントリヌクレオチド含有量が50%である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、2%以下である。例えば、いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、1.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.9%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.8%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.7%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.6%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.5%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.4%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.3%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.2%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、0.1%以下である。いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチドを有さない。

【0406】

いくつかの実施形態において、ORFは、ウリジントリヌクレオチド含有量が、その最小ウリジントリヌクレオチド含有量から、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジントリヌクレオチド含有量の90%以下であるウリジントリヌクレオチド含有量までの範囲である。いくつかの実施形態において、ORFのウリジントリヌクレオチド含有量は、問題となるmRNAと同じタンパク質をコードする参照配列の最大ウリジントリヌクレオチド含有量の約85%以下、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下である。

【0407】

例えば、ORFの十分な画分において最小ウリジンコドンを使用することによって、所与のORFは、ウリジン含有量またはウリジンジヌクレオチド含有量またはウリジントリヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ、ORFの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小ウリジンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、ORF中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表6に列挙されるコドンである。

【表 6】

表 6. 例示的な最小ウリジンコドン

|   | アミノ酸     | 最小ウリジンコドン                 |
|---|----------|---------------------------|
| A | アラニン     | G C A または G C C または G C G |
| G | グリシン     | G G A または G G C または G G G |
| V | バリン      | G U C または G U A または G U G |
| D | アスパラギン酸  | G A C                     |
| E | グルタミン酸   | G A A または G A G           |
| I | イソロイシン   | A U C または A U A           |
| T | スレオニン    | A C A または A C C または A C G |
| N | アスパラギン   | A A C                     |
| K | リジン      | A A G または A A A           |
| S | セリン      | A G C                     |
| R | アルギニン    | A G A または A G G           |
| L | ロイシン     | C U G または C U A または C U C |
| P | プロリン     | C C G または C C A または C C C |
| H | ヒスチジン    | C A C                     |
| Q | グルタミン    | C A G または C A A           |
| F | フェニルアラニン | U U C                     |
| Y | チロシン     | U A C                     |
| C | システイン    | U G C                     |
| W | トリプトファン  | U G G                     |
| M | メチオニン    | A U G                     |

10

20

## 【0408】

いくつかの実施形態において、ORFは、コドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%が、表6に列挙されるコドンである、コドンのセットからなる。

## 【0409】

## b) 低アデニンおよびウリジン含有量

実行可能な範囲で、低アデニン含有量に関して本明細書に記載される特徴のいずれかを、低ウリジン含有量に関して本明細書に記載される特徴のいずれかと組み合わせることができる。例えば、ウリジン含有量が、その最小ウリジン含有量～その最小ウリジン含有量の約150%の範囲であり（例えば、ORFのウリジン含有量は、その最小ウリジン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下であり）、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の約150%の範囲である（例えば、その最小アデニン含有量の約145%以下、140%以下、135%以下、130%以下、125%以下、120%以下、115%以下、110%以下、105%以下、104%以下、103%以下、102%以下、または101%以下である）ORFを含む、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）をコードする核酸（例えば、mRNA）が提供され得る。ウリジンおよびアデニンジヌクレオチドについても同様である。同様に、ORF中のウリジンヌクレオチドおよびアデニンジヌクレオチドの含有量は、上に記載した通りであってもよい。同様に、ORF中のウリジンヌクレオチドおよびアデニンヌクレオチドの含有量は、上に記載した通りであってもよい。

30

40

## 【0410】

例えば、ORFの十分な画分において最小ウリジンおよびアデニンコドンを使用することによって、所与のORFは、ウリジンおよびアデニンヌクレオチドおよび／またはジヌクレオチド含有量を低減することができる。例えば、RNAガイドDNA結合剤のアミノ酸配列は、アミノ酸をコドンに変換することによってORF配列に逆翻訳することができ

50

、O R Fの一部またはすべては、以下に示される例示的な最小ウリジンおよびアデニンコドンを使用する。いくつかの実施形態において、O R F中のコドンの少なくとも約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%、または約100%が、表7に列挙されるコドンである。

【表7】

表7. 例示的な最小ウリジンおよびアデニンコドン

|   | アミノ酸     | 最小ウリジンコドン             |
|---|----------|-----------------------|
| A | アラニン     | G C CまたはG C G         |
| G | グリシン     | G G CまたはG G G         |
| V | バリン      | G U CまたはG U G         |
| D | アスパラギン酸  | G A C                 |
| E | グルタミン酸   | G A G                 |
| I | イソロイシン   | A U C                 |
| T | スレオニン    | A C CまたはA C G         |
| N | アスパラギン   | A A C                 |
| K | リジン      | A A G                 |
| S | セリン      | A G CまたはU C CまたはU C G |
| R | アルギニン    | C G CまたはC G G         |
| L | ロイシン     | C U GまたはC U C         |
| P | プロリン     | C C GまたはC C C         |
| H | ヒスチジン    | C A C                 |
| Q | グルタミン    | C A G                 |
| F | フェニルアラニン | U U C                 |
| Y | チロシン     | U A C                 |
| C | システイン    | U G C                 |
| W | トリプトファン  | U G G                 |
| M | メチオニン    | A U G                 |

【0411】

いくつかの実施形態において、O R Fは、コドンの少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%が、表7に列挙されるコドンである、コドンのセットからなる。表7からわかるだろうが、列挙されている3つのセリンコドンの各々は、1個のAまたは1個のUのいずれかを含む。いくつかの実施形態において、ウリジン最小化は、セリンについてA G Cコドンを使用することによって優先される。いくつかの実施形態において、アデニン最小化は、セリンに対してU C Cおよび／またはU C Gコドンを使用することによって優先される。

【0412】

c) コードされたRNAガイドDNA結合剤

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、クラス2 Casヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、クリパーゼ活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casヌクレアーゼ、例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ（例えば、II型、V型またはVI型のCasヌクレアーゼであってもよい）を含む。クラス2 Casヌクレアーゼとしては、例えば、Cas9、Cpf1、C2c1、C2c2、およびC2c3タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Cas9ヌクレアーゼの例としては、S. pyogenes、S. aureus、および他の原核生物のII型CRISPR系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、US2016/0312198（A1）、US2016/0312199（A1）を参照のこと。Casヌクレアーゼの他の例としては、III型CRISPR系のCsmまたはCmr複合体、またはCas10、Csm1、もしくはそのCmr2サブユニット、およびI型CR



ISPR系のカスケード複合体、またはそのCas3サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、IIA型、IIB型、またはIIC型の系に由来していてもよい。様々なCRISPR系およびCasヌクレアーゼの考察については、例えば、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9:467-477 (2011)、Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 13:722-36 (2015)、Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015)を参照されたい。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casクリパーゼ、例えば、Cas9クリパーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、Casニッカーゼ、例えば、Cas9ニッカーゼである。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼ、例えば、クリパーゼである。

10

【0413】

Casヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、Streptococcus pyogenes、Streptococcus thermophilus、Streptococcus sp.、Staphylococcus aureus、Listeria innocua、Lactobacillus gasseri、Francisella novicida、Wolinella succinogenes、Sutterella wadsworthensis、Gammaproteobacterium、Neisseria meningitidis、Campylobacter jejuni、Pasteurella multocida、Fibrobacter succinogenes、Rhodospirillum rubrum、Nocardia opsis dassonvillei、Streptomyces pristinaespiralis、Streptomyces viridochromogenes、Streptomyces viridochromogenes、Streptosporangium roseum、Streptosporangium roseum、Alicyclobacillus acidocaldarius、Bacillus pseudomycooides、Bacillus selenitireducens、Exiguobacterium sibiricum、Lactobacillus delbrueckii、Lactobacillus salivarius、Lactobacillus buchneri、Treponema denticola、Microscilla marina、Burkholderiales bacterium、Polaromonas naphthalenivorans、Polaromonas sp.、Crocosphaera watsonii、Cyanotherce sp.、Microcystis aeruginosa、Synechococcus sp.、Acetohalobium arabaticum、Ammonifex degensii、Caldicelulosiruptor beccarii、Candidatus Desulforudis、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Finegoldia magna、Natranaerobius thermophilus、Pelotomaculum thermopropionicum、Acidithiobacillus caldus、Acidithiobacillus ferrooxidans、Allochroanium vinosum、Marinobacter sp.、Nitrosococcus halophilus、Nitrosococcus watsoni、Pseudoalteromonas haloplanktis、Ktedonobacter racemifer、Methanohalobium evestigatum、Anabaena variabilis、Nodularia spumigena、Nostoc sp.、Arthrospira maxima、Arthrospira platensis、Arthrospira sp.、Lyngbya sp.、Microcoleus chthonoplastes、Oscillatoria

20

30

40

50

sp.、*Petrotoga mobilis*、*Thermosiphon africanus*、*Streptococcus pasteurianus*、*Neisseria cinerea*、*Campylobacter lari*、*Parvibaculum lavamentivorans*、*Corynebacterium diphtheria*、*Acidaminococcus* sp.、*Lachnospiraceae bacterium ND2006*、および *Acaryochloris marina* が挙げられる。

#### 【0414】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus thermophilus* 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Neisseria meningitidis* 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Staphylococcus aureus* 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella novicida* 由来の Cpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* sp. 由来の Cpf1ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Lachnospiraceae bacterium ND2006* 由来の Cpf1ヌクレアーゼである。さらなる実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Francisella tularensis*、*Lachnospiraceae bacterium*、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Pergrinibacteria bacterium*、*Parcubacteria bacterium*、*Smithella*、*Acidaminococcus*、*Candidatus Methanoplasma termitum*、*Eubacterium eligens*、*Moraxella bovoculi*、*Leptospira inadai*、*Porphyromonas crevioricanis*、*Prevotella disiens*、または *Porphyromonas macacae* 由来の Cpf1ヌクレアーゼである。特定の実施形態において、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus* または *Lachnospiraceae* 由来の Cpf1ヌクレアーゼである。

#### 【0415】

野生型 Cas9 は、2つのヌクレアーゼドメイン、RuvCおよびHNHを有する。RuvCドメインは、非標的DNA鎖を切断し、HNHドメインは、DNAの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、1個より多いRuvCドメインおよび／または1個より多いHNHドメインを含む。いくつかの実施形態において、Cas9ヌクレアーゼは、野生型Cas9である。いくつかの実施形態において、Cas9は、標的DNAにおける二本鎖切断を誘導することができる。特定の実施形態において、Casヌクレアーゼは、dsDNAを切断してもよく、dsDNAの1つの鎖を切断してもよく、またはDNAクリパーゼまたはニッカーゼ活性を有していなくてもよい。例示的なCas9アミノ酸配列は、配列番号203として提供される。開始および終止コドンを含む例示的なCas9 mRNA ORF配列は、配列番号311として提供される。融合タンパク質に含めるのに好適な例示的なCas9 mRNAコード配列は、配列番号346として提供される。

#### 【0416】

いくつかの実施形態において、キメラCasヌクレアーゼが使用され、タンパク質の1つのドメインまたは領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼドメインは、FokIなどの異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

## 【0417】

他の実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、I型CRISPR/Cas系のカスケード複合体の構成要素であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Cas3タンパク質であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、III型CRISPR/Cas系由来であり得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、RNA切断活性を有し得る。

## 【0418】

## d) 異種機能ドメイン、核局在化シグナル

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）は、1つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、または融合ポリペプチドを含む）。

## 【0419】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、S. pyogenes Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（NLS）であり得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1～10個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1～5個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1個のNLSと融合され得る。1個のNLSが使用される場合、NLSは、RNAガイドDNA結合剤の配列のN末端部またはC末端部で連結され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、少なくとも1個のNLSに対してC末端に融合され得る。NLSを、RNAガイドDNA結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、1個より多いNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2、3、4、または5個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合され得る。特定の状況では、2個のNLSは、同じ（例えば、2個のSV40 NLS）であってもよく、または異なってもよい。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、カルボキシ末端部で連結された2個のSV40 NLSの配列に融合される。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、2個のNLSと融合していてもよく、1つはN末端部に連結しており、1つはC末端部に連結している。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、3個のNLSと融合され得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、NLSなしで融合され得る。いくつかの実施形態において、NLSは、単節型配列、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号278）またはPKKKRRV（配列番号290）であってもよい。いくつかの実施形態において、NLSは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのNLSであるKRPAATKKAGQAKKKK（配列番号291）であってもよい。いくつかの実施形態において、NLS配列は、LAAKRSRTT（配列番号279）、QAAKRSRTT（配列番号280）、PAPAKRERTT（配列番号281）、QAAKRPRRTT（配列番号282）、RAAKRPRRTT（配列番号283）、AAAKRSWSMAA（配列番号284）、AAAKRVWSMAF（配列番号285）、AAAKRSWSMAF（配列番号286）、AAAKRKYFAA（配列番号287）、RAAKRKAF（配列番号288）、またはRAAKRKYFAV（配列番号289）を含み得る。特定の実施形態において、単一のPKKKRKV（配列番号278）NLSは、RNAガイドDNA結合剤のC末端部で連結され得る。1つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。いくつかの実施形態において、前述の実施形態のいずれかの1つ以上のNLSは、以下に記載される異種機能ドメインのいずれかなどの1つ以上の追加の異種機能ドメインと組み合わせて、RNAガイドDNA結合剤中に存在する。例示的なNLSのコード配列は、配列番号292～304として提供される。

## 【0420】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）の細胞内半減期を改変することができる。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態において、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルペインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、PEST配列を含み得る。いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加によって修飾され得る。いくつかの実施形態において、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（UBL）であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修飾因子（SUMO）、ユビキチン交差反応性タンパク質（UCRP、インターフェロン刺激遺伝子-15（ISG15）としても知られる）、ユビキチン関連修飾因子-1（URM1）、神経前駆細胞が発現する発達の下方制御されたタンパク質-8（NEDD8、*S. cerevisiae*においてRub1とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原F関連（FAT10）、オートファジー-8（ATG8）および-12（ATG12）、Fauユビキチン様タンパク質（FUB1）、膜固定UBL（MUB）、ユビキチン折りたたみ修飾因子-1（UFM1）、およびユビキチン様タンパク質-5（UBL5）が挙げられる。

#### 【0421】

いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、マーカードメインであってもよい。マーカードメインの非限定的な例としては、蛍光タンパク質、精製タグ、エピトープタグ、およびレポーター遺伝子配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、マーカードメインは、蛍光タンパク質であってもよい。好適な蛍光タンパク質の非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、sfGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green、CopGFP、AceGFP、ZsGreen1）、黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、EYFP、Citrine、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）、青色蛍光タンパク質（例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）、シアン蛍光タンパク質（例えば、ECFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan）、赤色蛍光タンパク質（例えば、mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred）、および橙色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato）、または任意の他の適切な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態において、マーカードメインは、精製タグおよび／またはエピトープタグであってもよい。非限定的な例示的なタグとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、チオレドキシン（TRX）、ポリ（NANP）、タンデムアフィニティ精製（TAP）タグ、myc、AcV5、AU1、AU5、E、EC5、E2、FLAG、HA、nus、Softag 1、Softag 3、Strep、SBP、Glu-Glu、HSV、KT3、S、S1、T7、V5、VSV-G、6xHis、8xHis、ビオチンカルボキシル担体タンパク質（BCCP）、ポリ-His、およびカルモジュリンが挙げられる。非限定的な例示的なレポーター遺伝子としては、グ

10

20

30

40

50

ルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

#### 【0422】

追加の実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、*S. pyogenes* Cas9などのCas9ヌクレアーゼ）を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、RNAガイドDNA結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

#### 【0423】

さらなる実施形態において、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。RNAガイドDNA結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、Casヌクレアーゼが、gRNAによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態において、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非Casヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例えばFokIヌクレアーゼである。例えば、米国特許第9,023,649号を参照のこと。いくつかの実施形態において、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression”, *Cell* 152:1173-83 (2013)、Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors”, *Nat. Methods* 10:973-6 (2013)、Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering”, *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013)、Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes”, *Cell* 154:442-51 (2013)を参照のこと。したがって、RNAガイドDNA結合剤は、本質的に、ガイドRNAを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。特定の実施形態において、DNA修飾ドメインは、脱メチル化ドメインまたはメチルトランスフェラーゼドメインなどのメチル化ドメインである。特定の実施形態において、エフェクタードメインは、塩基編集ドメインなどのDNA修飾ドメインである。特定の実施形態において、DNA修飾ドメインは、DNAに特異的修飾、例えばデアミナーゼドメインを導入する核酸編集ドメインである。例えば、WO2015/089406、US 2016/0304846を参照のこと。WO2015/089406およびUS 2016/0304846に記載されている核酸編集ドメイン、デアミナーゼドメイン、およびCas9バリエーションは、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0424】

##### e) UTR、Kozak配列

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、5'UTR、3'UTR、または5'UTRおよび3'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、ヒドロキシステロイド 17- $\beta$ -ヒドロゲナーゼ4 (HSD17B4またはHSD) 由来の少なくとも1つのUTR、例えば、HSD由来の5'UTRを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）は、グロビンmRNA、例えば、ヒトアルファグロビン (HBA) mRNA、ヒトベータグロビン (HBB) mRNA、または*Xenopus laevis* ベータグロ

10

20

30

40

50

ビン (X B G) m R N A 由来の少なくとも 1 つの U T R を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、グロビン m R N A、例えば、H B A、H B B、または X B G 由来の 5 ' U T R、3 ' U T R、または 5 ' および 3 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス (C M V)、マウス H b a - a 1、H S D、アルブミン遺伝子、H B A、H B B、または X B G 由来の 5 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウス H b a - a 1、H S D、アルブミン遺伝子、H B A、H B B、または X B G 由来の 3 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウス H b a - a 1、H S D、アルブミン遺伝子、H B A、H B B、X B G、熱ショックタンパク質 9 0 (H s p 9 0)、グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H)、ベータ - アクチン、アルファチューブリン、腫瘍タンパク質 (p 5 3)、または上皮成長因子受容体 (E G F R) 由来の 5 ' および 3 ' U T R を含む。

#### 【 0 4 2 5 】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、同じ供給源、例えば、アクチン、アルブミン、または H B A、H B B、または X B G などのグロビンなどの構成的に発現された m R N A 由来の 5 ' および 3 ' U T R を含む。

#### 【 0 4 2 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号 2 3 2、2 3 4、2 3 6、2 3 8、2 4 1、または 2 7 5 ~ 2 7 7 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 5 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 3 9、または 2 4 0 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 9 0 % の同一性を有する 3 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、前述の同一性レベルのいずれかは、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % である。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号 2 3 2、2 3 4、2 3 6、2 3 8、または 2 4 1 のうちのいずれか 1 つの配列を有する 5 ' U T R を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される核酸は、配列番号 2 3 3、2 3 5、2 3 7、2 3 9、または 2 4 0 のうちのいずれか 1 つの配列を有する 3 ' U T R を含む。

#### 【 0 4 2 7 】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、5 ' U T R を含まず、例えば、5 ' キャップと開始コドンとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、5 ' キャップと開始コドンとの間に K o z a k 配列 (以下に記載される) を含むが、任意の追加の 5 ' U T R を有しない。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、3 ' U T R を含まず、例えば、終止コドンとポリ A テールとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。

#### 【 0 4 2 8 】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、m R N A) は、K o z a k 配列を含む。K o z a k 配列は、核酸から翻訳されるポリペプチドの翻訳開始および全収率に影響を及ぼす可能性がある。K o z a k 配列は、開始コドンとして機能し得るメチオニンコドンを含む。最小 K o z a k 配列は、N N N R U G N であり、以下のうちの少なくとも 1 つが真である。第 1 の N が A または G であり、第 2 の N が G である。ヌクレオチド配列の文脈において、R は、プリン (A または G) を意味する。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、R N N R U G N、N N N R U G G、R N N R U G G、R N N A U G N、N N N A U G G、または R N N A U G G である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または 1 個もしくは 2 個までのミスマッチを有する r c c R U G g である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または 1 個も

しくは2個までのミスマッチを有する r c c A U G g である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、もしくは3個までのミスマッチを有する g c c R c c A U G G (配列番号305のヌクレオチド4~13)である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、3個、もしくは4個までのミスマッチを有する g c c A c c A U G である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、G C C A C C A U G である。いくつかの実施形態において、K o z a k 配列は、小文字の位置に対して、ミスマッチがゼロであるか、または1個、2個、3個、もしくは4個までのミスマッチを有する g c c g c c R c c A U G G (配列番号305)である。

10

【0429】

## f) ポリAテール

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド(例えば、mRNA)は、ポリアデニル化(ポリA)テールをさらに含む。場合によっては、ポリAテールは、ポリAテール内の1つ以上の位置で、1つ以上の非アデニンヌクレオチド「アンカー」で「中断される」。ポリAテールは、少なくとも8個の連続するアデニンヌクレオチドを含み得るが、1個以上の非アデニンヌクレオチドも含む。本明細書で使用される場合、「非アデニンヌクレオチド」は、アデニンを含まない任意の天然または非天然ヌクレオチドを指す。グアニン、チミン、およびシトシンヌクレオチドは、例示的な非アデニンヌクレオチドである。したがって、本明細書に記載のポリヌクレオチド(例えば、mRNA)上のポリAテールは、目的のRNAガイドDNA結合剤または配列をコードするヌクレオチドに対して3'に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含み得る。場合によっては、mRNA上のポリAテールは、RNAガイドDNA結合剤または目的の配列をコードするヌクレオチドに対して3'に位置する非連続アデニンヌクレオチドを含み、非アデニンヌクレオチドは、規則的な間隔もしくは不規則な間隔でアデニンヌクレオチドを中断する。

20

【0430】

いくつかの実施形態において、ポリAテールは、mRNAのインビトロ転写に使用されるプラスミドにコードされ、転写産物の一部となる。プラスミドにコードされるポリA配列、すなわち、ポリA配列中の連続するアデニンヌクレオチドの数は、正確でなくてもよく、例えば、プラスミド中の100個のポリA配列は、転写されたmRNA中に正確に100個のポリA配列を生じさせなくてもよい。いくつかの実施形態において、ポリAテールは、プラスミドにコードされておらず、PCRテーリングまたは酵素テーリングによって、例えば、E. coli ポリ(A)ポリメラーゼを使用して追加される。

30

【0431】

いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、ポリ(A)結合タンパク質が一連の連続するアデニンヌクレオチドに結合することができるように、連続したアデニンヌクレオチドを中断するように配置される。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8~50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8~100個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、または7個のアデニンヌクレオチドの後にあり、その後に少なくとも8個の連続するアデニンヌクレオチドが続く。

40

【0432】

本開示のポリAテールは、連続するアデニンヌクレオチドの1個の配列と、それに続く1個以上の非アデニンヌクレオチドと、任意選択で、追加のアデニンヌクレオチドとを含み得る。

【0433】

50

いくつかの実施形態において、ポリAテールは、1個の非アデニンヌクレオチドまたは1個の連続する一連の2～10個の非アデニンヌクレオチドを、含むかまたは含有する。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、または12個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。場合によっては、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8～50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。いくつかの実施形態において、1個以上の非アデニンヌクレオチドは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50個の連続するアデニンヌクレオチドの後に位置する。

【0434】

いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、グアニン、シトシン、またはチミンである。場合によっては、非アデニンヌクレオチドはグアニンヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、シトシンヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、非アデニンヌクレオチドは、チミンヌクレオチドである。場合によっては、1個より多い非アデニンヌクレオチドが存在する場合、非アデニンヌクレオチドは、a) グアニンおよびチミンヌクレオチド、b) グアニンおよびシトシンヌクレオチド、c) チミンおよびシトシンヌクレオチド、またはd) グアニン、チミンおよびシトシンヌクレオチドから選択されてもよい。非アデニンヌクレオチドを含む例示的なポリAテールは、配列番号262として提供される。

【0435】

#### g) 修飾ヌクレオチド

いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸は、一部またはすべてのウリジン位置に、修飾ウリジンを含む。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲンまたはC1～C3アルコキシで、5位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、例えば、C1～C3アルコキシで、1位で修飾されたシュードウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、シュードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、N1-メチルシュードウリジンである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンとN1-メチルシュードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、N1-メチルシュードウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンとN1-メチルシュードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、シュードウリジンと5-ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態において、修飾ウリジンは、5-ヨードウリジンと5-メトキシウリジンの組み合わせである。

【0436】

いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%は、修飾ウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%～25%、15～25%、25～35%、35～45%、45～55%、55～65%、65～75%、75～85%、85～95%、または90～100%は、修飾ウリジン、例えば、5-メトキシウリジン、5-ヨードウリジン、N1-メチルシュードウリジン、シュードウリジン、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態において、核酸中



のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-メトキシウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、シユードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、N1-メチルシユードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-ヨードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-メトキシウリジンであり、残りは、N1-メチルシユードウリジンである。いくつかの実施形態において、核酸中のウリジン位置の10%~25%、15~25%、25~35%、35~45%、45~55%、55~65%、65~75%、75~85%、85~95%、または90~100%は、5-ヨードウリジンであり、残りは、N1-メチルシユードウリジンである。

【0437】

#### h) 5' キャップ

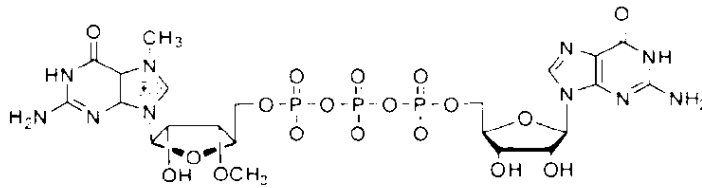
いくつかの実施形態において、RNAガイドDNA結合剤をコードするORFを含む核酸（例えば、mRNA）は、5' キャップ、例えば、Cap 0、Cap 1、またはCap 2を含む。5' キャップは、一般に、核酸の5'-3' 鎖の第1のヌクレオチド（すなわち、第1のキャップ近位のヌクレオチド）の5' 位に対して5'-トリホスフェートを介して連結した7-メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ARCAに関して、以下に記載されるようにさらに修飾されてもよい）である。Cap 0において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-ヒドロキシルを含む。Cap 1において、mRNAの第1および第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシおよび2'-ヒドロキシルを含む。Cap 2において、mRNAの第1および第2のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、2'-メトキシを含む。例えば、Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33):12025-30、Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11):E2106-E2115を参照のこと。ヒト核酸などの哺乳動物核酸を含む、ほとんどの内因性の高級真核生物mRNAは、Cap 1またはCap 2を含む。Cap 0、およびCap 1およびCap 2とは異なる他のキャップ構造は、IFIT-1およびIFIT-5等の自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒト等の哺乳動物において免疫原性である場合があり、I型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。IFIT-1およびIFIT-5などの自然免疫系の構成要素はまた、Cap 1またはCap 2以外のキャップとの核酸の結合についてeIF4Eと競合する場合があり、mRNAの翻訳を潜在的に阻害する。

【0438】

キャップは、RNA中に共転写的に含めることができる。例えば、ARCA（抗逆キャップ類似体、Thermo Fisher Scientificカタログ番号AM8045）は、グアニンリボヌクレオチドの5' 位に連結する7-メチルグアニン 3'-メトキシ-5'-トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。ARCAは、第1のキャップ近位のヌクレオチドの2' 位がヒドロキシルであるCap 0キャップをもたらす。例えば、Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap anal

ogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG, "RNA 7:1486-1495を参照のこと。ARC Aの構造を以下に示す。

【化6】



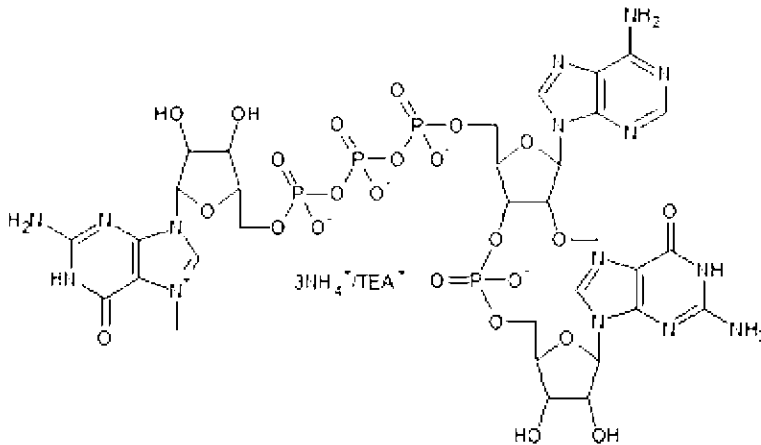
10

【0439】

CleanCap (商標) AG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeA) pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7113) またはCleanCap (商標) GG (m7G (5') ppp (5') (2' OMeG) pG、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7133) を使用して、Cap1構造を共転写的に提供することができる。CleanCap (商標) AGおよびCleanCap (商標) GGの3'-O-メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号N-7413およびN-7433としてTriLink Biotechnologiesから入手可能である。CleanCap (商標) AGの構造を以下に示す。CleanCap (商標) 構造は、本明細書において、上に列挙されているカタログ番号の最後の3桁を使用して言及されることがある (例えば、TriLink Biotechnologiesカタログ番号N-7113について「CleanCap (商標) 113」)。

20

【化7】



30

【0440】

あるいは、転写後に、キャップをRNAに付加することができる。例えば、Vacciniaキャッピング酵素は市販されており (New England Biolabs カタログ番号M2080S)、そのD1サブユニットによって与えられるRNAトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのD12サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、S-アデノシルメチオニンおよびGTPの存在下で、Cap0を与えるように、7-メチルグアニンをRNAに付加することができる。例えば、Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027、Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol. Chem. 269, 24472-24479を参照のこと。キャップおよびキャッピングアプローチの追加の考察については、例えば、WO2017/053297およびIshikawa et al., Nucl. Acids. Symp. Ser. (2009) No. 53, 129-130を

40

50

参照のこと。

【0441】

D. RNAの有効性の決定

いくつかの実施形態において、gRNAの有効性は、他の構成要素、例えば、本明細書に記載されるもののいずれかなどのRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸とともに送達されるときに決定される。いくつかの実施形態において、gRNAとRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸との組み合わせの有効性が決定される。

【0442】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるRNAガイドDNAヌクレアーゼおよびガイドRNAの使用は、DNAにおいて二本鎖切断を生じる場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの変異は、リーディングフレームを変化させるか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。

【0443】

いくつかの実施形態において、特定のgRNAまたは組み合わせの有効性は、インビトロモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HEK293細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HUH7ヒト肝臓がん細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、HepG2細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態において、インビトロモデルは、初代カニクイザル肝細胞である。初代ヒト肝細胞を使用することに関して、市販の初代ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態において、インビトロモデルにおいて（例えば、初代ヒト肝細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでCas9 mRNAおよびガイドRNAでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することによって、決定される。いくつかの実施形態において、そのような決定は、インビトロでCas9 mRNA、ガイドRNA、およびドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムDNAを分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を以下の作業実施例に提供する。

【0444】

いくつかの実施形態において、特定のgRNAまたは組み合わせの有効性は、gRNA選択プロセスのための複数のインビトロ細胞モデルにわたって決定される。いくつかの実施形態において、選択されたgRNAとのデータの細胞株比較が行われる。いくつかの実施形態において、複数の細胞モデルで交差スクリーニングを実施する。

【0445】

いくつかの実施形態において、特定のgRNAまたは組み合わせの有効性は、インビボモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態において、インビボモデルは、げっ歯類モデルである。いくつかの実施形態において、げっ歯類モデルは、変異体ヒトTTR遺伝子であり得るヒトTTR遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態において、インビボモデルは、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルである。

【0446】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAまたは組み合わせの有効性は、TTRの編集パーセントによって測定される。いくつかの実施形態において、TTRの編集パーセントを、例えば、インビトロモデルの場合は全細胞培養物において、またはインビボモデルの場合は血清または組織において、TTRタンパク質のノックダウンを達成するために必要な編集パーセントと比較する。

【0447】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAまたは組み合わせの有効性は、標的細胞型のゲノム内のオフターゲット配列におけるインデルの数および／または頻度によって測定される。いくつかの実施形態において、細胞集合体において、および／または標的部位に

10

20

30

40

50

おけるインデル生成の頻度と比較して、非常に低い頻度（例えば、5 %未満）で、オフターゲット部位でインデルを生成する有効なガイドRNAおよび組み合わせが提供される。したがって、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）においてオフターゲットインデル形成を示さないか、または細胞集合体において、および／または標的部位でのインデル生成の頻度と比較して、オフターゲットインデル形成の頻度が5 %未満であるガイドRNAを提供する。いくつかの実施形態において、本開示は、標的細胞型（例えば、肝細胞）において任意のオフターゲットインデル形成を示さないガイドRNAおよび組み合わせを提供する。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、5個未満のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドRNAおよび組み合わせが提供される。いくつかの実施形態において、例えば、本明細書に記載される1つ以上の方法によって評価される場合、4、3、2、または1個以下のオフターゲット部位においてインデルを生成するガイドRNAおよび組み合わせが提供される。いくつかの実施形態において、オフターゲット部位は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム内のタンパク質コード領域内では発生しない。

#### 【0448】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、WO2018/067447またはSchmidt et al., Nature Methods 4:1051-1057 (2007)に記載されるように、タグ化プライマーを用いた線形増幅およびタグ化増幅産物の単離を利用する（本明細書ではこれ以降、「LAM-PCR」または「線形増幅（LA）」法と呼ばれる）。

#### 【0449】

いくつかの実施形態において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、線形増幅産物またはさらなる増幅産物をシーケンシングすることをさらに含む。シーケンシングは、次世代配列決定、および線形増幅産物またはさらなる増幅産物のプラスミドへのクローニング、プラスミドまたはプラスミドの一部のシーケンシングを含め、当業者に既知の任意の方法を含んでもよい。例示的な次世代シーケンシング方法は、例えば、Shendure et al., Nature 26:1135-1145 (2008)に記載される。他の態様において、遺伝子編集事象、例えば、挿入／欠失（「インデル」）変異の形成、および標的DNAにおける相同性誘導修復（HDR）事象を検出することは、線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物に対してデジタルPCR（dPCR）またはドロップレットデジタルPCR（ddPCR）を行うこと、または線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物と、HDRテンプレート配列を含むDNAを同定するように設計された核酸プローブとを接触させること、および線形増幅産物もしくはさらなる増幅産物に結合したプローブを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態において、本方法は、標的DNAにおけるHDRテンプレートの位置を決定することをさらに含む。

#### 【0450】

特定の実施形態において、本方法は、標的DNA内の挿入部位の配列を決定することをさらに含み、挿入部位は、HDRテンプレートが標的DNAに組み込まれる位置であり、挿入部位は、いくつかの標的DNA配列およびいくつかのHDRテンプレート配列を含み得る。

#### 【0451】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAまたは組み合わせの有効性は、TTRの分泌によって測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、細胞培地または血清を用いた酵素結合免疫吸着（ELISA）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、編集を測定するために使用されるのと同じインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、初代ヒト肝細胞において測定される。いくつかの実施形態において、TTRの分泌は、HUH7細胞において測定される。いくつかの実施形態において、TTRの

分泌は、Hep G 2 細胞において測定される。

【0452】

ELISA アッセイは、当業者に一般的に知られており、血清 TTR レベルを決定するように設計することができる。例示的な一実施形態において、血液を収集し、血清を単離する。全 TTR 血清レベルは、Mouse Prealbumin (Transthyretin) ELISA Kit (Aviva Systems Biology、型番 OKIA00111) またはヒト TTR を測定するための同様のキットを使用して決定され得る。キットが利用可能ではない場合、測定するときに TTR に特異的な捕捉抗体で事前にコーティングされたプレートを使用して、ELISA を開発することができる。プレートを室温で所定時間インキュベートした後、洗浄する。酵素-抗 TTR 抗体コンジュゲートを添加し、インキュベートする。未結合の抗体コンジュゲートを除去し、プレートを洗浄した後、酵素と反応する発色基質溶液を添加する。プレートを、使用される酵素および基質に特有の吸光度で、適切なプレートリーダーで読み取る。

10

【0453】

いくつかの実施形態において、細胞（組織由来のものを含む）中の TTR の量は、gRNA または組み合わせの有効性を測定する。いくつかの実施形態において、細胞中の TTR の量は、ウェスタンブロットを使用して測定される。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、HUH 7 細胞である。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態において、使用される細胞は、動物から得られる初代細胞である。いくつかの実施形態において、TTR の量を、細胞数の変化を制御するために、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ GAPDH（ハウスキーパー遺伝子）の量と比較する。

20

【0454】

III. LNP 製剤および ATR の治療

いくつかの実施形態において、TTR 遺伝子内の二本鎖切断 (DSB) を誘導する方法であって、本明細書に記載されるガイド RNA を含む（例えば、配列番号 5~82 のうちのいずれか 1 つ以上のガイド配列、または配列番号 87~124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含む）組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 5~82 のガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上を含む gRNA が投与され、TTR 遺伝子内の DSB を誘導する。ガイド RNA は、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ、例えば、Cas ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸（例えば、mRNA）またはベクターとともに投与される。RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9 であってもよい。特定の実施形態において、ガイド RNA は化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイド RNA および RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載の LNP、例えば、CCD 脂質（例えば、脂質 A などのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG などの PEG 脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含む LNP で投与される。

30

【0455】

いくつかの実施形態において、TTR 遺伝子内の二本鎖切断 (DSB) を誘導する方法であって、配列番号 5~72、74~78、および 80~82 のいずれか 1 つ以上のガイド配列、または配列番号 87~113、115~120、および 122~124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上を含むガイド RNA（例えば、化学修飾されたガイド RNA）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号 87~113、115~120、および 122~124 の sgRNA のうちのいずれか 1 つ以上、または配列番号 5~72、74~78、および 80~82 のガイド配列のいずれか 1 つ以上を含む gRNA が投与され、TTR 遺伝子内の DSB を誘導する。ガイド RNA は、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ、例えば、Cas ヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9 であっても

40

50

よい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0456】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子を修飾する方法であって、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、TTR遺伝子を修飾する。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0457】

いくつかの実施形態において、TTR遺伝子を修飾する方法であって、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、TTR遺伝子を修飾する。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0458】

いくつかの実施形態において、ATTRを治療する方法であって、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、ATTRを治療する。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、

ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0459】

いくつかの実施形態において、ATTRを治療する方法であって、配列番号5〜72、74〜78、および80〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜113、115〜120、および122〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むガイドRNAを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5〜72、74〜78、および80〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜113、115〜120、および122〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、ATTRを治療する。ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0460】

いくつかの実施形態において、TTR血清濃度を低減する方法であって、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0461】

いくつかの実施形態において、TTR血清濃度を低減する方法であって、本明細書に記載のガイドRNA（例えば、配列番号5〜72、74〜78、および80〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜113、115〜120、および122〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5〜72、74〜78、および80〜82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87〜113、115〜120、および122〜124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつか

の実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0462】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、配列番号87～113のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0463】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、本明細書に記載されるガイドRNA（例えば、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する方法であって、配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、配列番号5～72、74～78、および80～82のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または配列番号87～113、115～120、および122～124のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAが投与され、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるTTRの蓄積を低減もしくは予防する。gRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、Casヌクレアーゼ（例えば、Cas9）をコードする本明細書に記載される核酸またはベクターとともに投与される。RNAガイドDNAヌクレアーゼは、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

#### 【0464】

いくつかの実施形態において、表1のガイド配列もしくは表2からの1つ以上のsgRNAを、RNAガイドDNAヌクレアーゼ、例えば、核酸から翻訳されたCasヌクレアーゼと一緒に含むgRNAは、DSBを誘導し、修復中の非相同性末端結合（NHEJ）

10

20

30

40

50



が、T T R 遺伝子内の変異をもたらす。いくつかの実施形態において、N H E J は、ヌクレオチド変異の欠失または挿入を引き起こし、T T R 遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンスを誘導する。

【0465】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸を（例えば、本明細書に提供される組成物で）投与することは、対象におけるT T R のレベル（例えば、血清レベル）を低下させ、したがって、アミロイドもしくはアミロイド原線維におけるT T R の蓄積および凝集を予防する。

【0466】

いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるT T R の蓄積および凝集を低減もしくは予防することは、対象の1つ以上の組織、例えば、胃、結腸、または神経組織におけるT T R 沈着を低減または予防することを含む。いくつかの実施形態において、神経組織は、坐骨神経または後根神経節を含む。いくつかの実施形態において、T T R 沈着は、胃、結腸、坐骨神経、および後根神経節のうちの2つ、3つ、または4つにおいて低減する。所与の組織における沈着のレベルは、例えば、免疫染色を使用して、生検試料を使用して決定することができる。いくつかの実施形態において、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるT T R の蓄積を低減もしくは予防すること、および／またはT T R 沈着を低減もしくは予防することは、所定時間、血清T T R レベルを低減することに基づいて推測される。実施例で考察されるように、本明細書で提供される方法および使用に従って血清T T R レベルを低減することによって、例えば、組成物の投与の8週間後に測定されるように、上および実施例で考察されるものなどの組織から沈着したT T R のクリアランスを引き起こし得ることが見出されている。

【0467】

いくつかの実施形態において、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコ、魚、または家禽である。

【0468】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の1つ以上のガイドRNA（例えば、表1のガイド配列のうちのいずれか1つ以上、または表2からの1つ以上のsgRNAを含む）（例えば、本明細書で提供される組成物で）の使用、ならびにRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸（例えば、mRNA）の使用は、A T T R を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のために提供される。RNAガイドDNA結合剤は、Cas9、例えば、S. pyogenes Cas9であってもよい。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。

【0469】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよび核酸を含む組成物は、静脈内に投与される。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよび核酸を含む組成物は、肝循環に投与される。

【0470】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNAおよび核酸を含む組成物の単回投与は、変異体タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNAおよび核酸を含む組成物の単回投与は、細胞の集合体における変異体タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。他の実施形態において、本明細書で提供されるガイドRNAおよび核酸を含む組成物の1回より多い投与は、累積的な効果によって編集を最大化するのに有益であり得る。例えば、本明細書で提供される組成物は、2回、3回、4回、5回、またはさらに多く、例えば、2回投与することができる。投与は、例えば、1日間～2年間、例えば、1日間～7日間、7日間～14日間、14日間～30日間、30日間～60日間、60日間～120日間、120日間～183日間、183日間～274日間、274日間～366日間、または366日間～2年間の範囲の期間で分割することができる。

## 【0471】

いくつかの実施形態において、組成物は、 $0.01 \sim 10 \text{ mg/kg}$  (mpk)、例えば、 $0.01 \sim 0.1 \text{ mpk}$ 、 $0.1 \sim 0.3 \text{ mpk}$ 、 $0.3 \sim 0.5 \text{ mpk}$ 、 $0.5 \sim 1 \text{ mpk}$ 、 $1 \sim 2 \text{ mpk}$ 、 $2 \sim 3 \text{ mpk}$ 、 $3 \sim 5 \text{ mpk}$ 、 $5 \sim 10 \text{ mpk}$ の範囲、または $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.3$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $3$ 、 $5$ 、もしくは $10 \text{ mpk}$ の有効量で投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、 $2 \sim 4 \text{ mg/kg}$ 、例えば、 $2.5 \sim 3.5 \text{ mg/kg}$ の量で投与される。いくつかの実施形態において、組成物は、約 $3 \text{ mg/kg}$ の量で投与される。

## 【0472】

いくつかの実施形態において、本明細書の組成物による治療の有効性は、送達から1年後、2年後、3年後、4年後、5年後、または10年後にみられる。いくつかの実施形態において、本発明の組成物による治療の有効性は、治療の前後のTTRの血清レベルを測定することによって評価される。いくつかの実施形態において、TTRの血清レベルの低減によって評価される、組成物による治療の有効性は、1週目、2週目、3週目、4週目、2ヶ月目、3ヶ月目、4ヶ月目、5ヶ月目、6ヶ月目、7ヶ月目、8ヶ月目、9ヶ月目、10ヶ月目、または11ヶ月目でみられる。

10

## 【0473】

いくつかの実施形態において、治療は、疾患の進行を遅らせるか、または止める。

## 【0474】

いくつかの実施形態において、治療は、FAPの進行を遅らせるか、または止める。いくつかの実施形態において、治療は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーの症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。

20

## 【0475】

いくつかの実施形態において、治療は、FACの症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。いくつかの実施形態において、治療は、拘束型心筋症またはうっ血性心不全の症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。

## 【0476】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、対象の生存時間の増加によって測定される。

## 【0477】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーの症状の改善、またはその進行の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、身体のある領域を移動させるか、または身体の任意の領域において感じる能力の増加、または低減の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、嚥下、呼吸、腕、手、脚、または足の使用、または歩行の能力の改善または能力の増加、または低減の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、神経痛の進行の改善、または遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、神経痛は、疼痛、熱傷、しびれ、または異常な感覚を特徴とする。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、姿勢低血圧、めまい、消化管運動障害、膀胱機能障害、または性機能障害の改善、または増加の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、脱力の進行の改善または遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、筋電図、神経伝導検査、または患者が報告する転帰を使用して測定される。

30

40

## 【0478】

いくつかの実施形態において、治療の有効性は、うっ血性心不全またはCHFの症状の改善または進行の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、息切れ、呼吸困難、疲労、足首、足、脚、腹部、または首の静脈の腫脹の低減または増加の遅れによって測定される。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、体内の流体蓄積の改善または進行の遅れによって測定され、体重増加、頻尿、または夜間の咳などの尺度によって評価されてもよい。いくつかの実施形態において、治療の有効性は、心

50

臓バイオマーカー試験（例えば、B型ナトリウム利尿ペプチド〔BNP〕またはN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド〔NT-proBNP〕）、肺機能検査、胸部x線、または心電図法を使用して測定される。

【0479】

#### A. 併用療法

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載のgRNAのいずれか1つ（例えば、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含む）、および本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、本明細書に提供される組成物で）、例えば、S.pyogenes Cas9をコードする本明細書に記載の核酸（例えば、mRNA）またはベクターを、ATTRの症状を緩和するのに適した追加の療法と合わせて投与することを含む、併用療法を含む。特定の実施形態において、ガイドRNAは化学修飾されている。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸は、本明細書に記載のLNP、例えば、CCD脂質（例えば、脂質Aなどのアミン脂質）、ヘルパー脂質（例えば、コレステロール）、ステルス脂質（例えば、PEG2k-DMGなどのPEG脂質）、および任意選択で中性脂質（例えば、DSPC）を含むLNPで投与される。

【0480】

いくつかの実施形態において、ATTRのための追加の療法は、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーのための治療である。いくつかの実施形態において、感覚運動ニューロパチーまたは自律神経ニューロパチーのための治療は、非ステロイド性抗炎症薬、抗うつ薬、抗けいれん薬、抗不整脈薬、または麻薬剤である。いくつかの実施形態において、抗うつ薬は、三環系薬剤またはセロトニン-ノルエピネフリン再取り込み阻害剤である。いくつかの実施形態において、抗うつ薬は、アミトリプチリン、デュロキセチン、またはベンラファキシンである。いくつかの実施形態において、抗けいれん薬は、ガバペンチン、プレガバリン、トピラメート、またはカルバマゼピンである。いくつかの実施形態において、感覚運動ニューロパチーのための追加の療法は、経皮的電気神経刺激である。

【0481】

いくつかの実施形態において、ATTRのための追加の療法は、拘束型心筋症またはうっ血性心不全（CHF）のための治療である。いくつかの実施形態において、CHFの治療は、ACE阻害剤、アルドステロンアンタゴニスト、アンジオテンシン受容体遮断薬、ベータ遮断薬、ジゴキシン、利尿薬、またはイソソルビド二硝酸塩／ヒドララジン塩酸塩である。いくつかの実施形態において、ACE阻害剤は、エナラプリル、カプトプリル、ラミプリル、ペリンドプリル、イミダプリル、またはキナプリルである。いくつかの実施形態において、アルドステロンアンタゴニストは、エプレレノンまたはスピロノラクトンである。いくつかの実施形態において、アンジオテンシン受容体遮断薬は、アジルサルタン、カデサルタン、エプロサルタン、イルベサルタン、ロサルタン、オルメサルタン、テルミサルタン、またはバルサルタンである。いくつかの実施形態において、ベータ遮断薬は、アセブトロール、アテノロール、ビソプロロール、メトプロロール、ナドロール、ネビボロール、またはプロプラノロールである。いくつかの実施形態において、利尿薬は、クロロチアジド、クロルタリドン、ヒドロクロロチアジド、インダパミド、メトラゾン、ブメタニド、フロセミド、トルセミド、アミロリド、またはトリアメテレンである。

【0482】

いくつかの実施形態において、併用療法は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のsgRNAのうちのいずれか1つ以上を含むgRNAのいずれか1つ、およびRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、本明細書に提供される組成物で）を、ATTRまたは変異体ATTRを標的とするsiRNAとともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、siRNAは、野生型または変異体ATTRの発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のsiRNAである。いくつか

の実施形態において、s i R N Aは、薬物パチシラン（A L N - T T R O 2）またはA L N - T T R s c O 2である。いくつかの実施形態において、s i R N Aは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のs g R N Aのうちのいずれか1つ以上を含むg R N Aのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）の後に投与される。いくつかの実施形態において、s i R N Aは、本明細書で提供されるg R N A組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

#### 【0483】

いくつかの実施形態において、併用療法は、本明細書に記載のガイド配列（例えば、表1に開示されるもの）のうちのいずれか1つ以上、または表2のs g R N Aのうちのいずれか1つ以上を含むg R N Aのうちのいずれか1つ、および本明細書に記載のRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、本明細書に提供される組成物で）を、T T Rまたは変異体T T Rを標的とするアンチセンスヌクレオチドとともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、野生型または変異体T T Rの発現をさらに低減するか、またはなくすことができる任意のアンチセンスヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、薬物イノテルセン（I O N S - T T R R x）である。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のs g R N Aのうちのいずれか1つ以上を含むg R N Aのいずれか1つ、およびRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、本明細書に提供される組成物で）の後に投与される。いくつかの実施形態において、アンチセンスヌクレオチドは、本明細書で提供されるg R N A組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

#### 【0484】

いくつかの実施形態において、併用療法は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のs g R N Aのうちのいずれか1つ以上を含むg R N Aのいずれか1つ、およびRNAガイドDNA結合剤をコードする核酸（例えば、本明細書に提供される組成物で）を、T T Rの正しくフォールディングされた四量体形態の動的安定化を促進する小分子安定剤とともに投与することを含む。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、薬物タファミジス（V y n d a q e l（登録商標））またはジフルニサルである。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、表1に開示されるガイド配列のうちのいずれか1つ以上または表2のs g R N Aのうちのいずれか1つ以上を含むg R N Aのいずれか1つ（例えば、本明細書で提供される組成物で）の後に投与される。いくつかの実施形態において、小分子安定剤は、本明細書で提供される組成物のいずれかで治療した後に、定期的に投与される。

#### 【0485】

前述の実施形態のいずれかにおいて、表1に開示されるガイド配列は、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されてもよく、および／または表2のs g R N Aは、配列番号87～113、115～120、および122～124から選択されてもよく、および／またはガイドRNAは、化学修飾されたガイドRNAであってもよい。

#### 【0486】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、注入予防を含む。いくつかの実施形態において、注入予防は、遺伝子編集組成物の前に対象に投与される。いくつかの実施形態において、注入予防は、核酸組成物の投与の8～24時間前または1～2時間前に対象に投与される。いくつかの実施形態において、注入予防は、コルチコステロイドを含む。いくつかの実施形態において、注入予防は、コルチコステロイド、疼痛および熱を低減させ、かつ／またはC O X酵素および／またはプロスタグランジンを阻害し得る解熱剤（例えば、経口アセトアミノフェン（パラセタモールとも呼ばれる））、H1遮断薬、またはH2遮断薬のうちの1つ以上、またはすべてを含む。いくつかの実施形態において、注入予防は、静脈内コルチコステロイド（デキサメタゾン8～12mg、例えば、10mgまたは等価物）および解熱剤（例えば、経口アセトアミノフェンまたはパラセタモール500mg）を含む。いくつかの実施形態において、H1遮断薬（例えば、ジフェンヒ

ドラミン50mgまたは等価物)および/またはH2遮断薬(例えば、ラニチジン50mgまたは等価物)は、経口投与される。いくつかの実施形態において、H1遮断薬(例えば、ジフェンヒドラミン50mgまたは等価物)および/またはH2遮断薬(例えば、ラニチジン50mgまたは等価物)は、静脈内投与される。いくつかの実施形態において、注入予防は、核酸組成物の注入の1~2時間前に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、静脈内H1遮断薬および/または静脈内H2遮断薬は、経口等価物に置き換えられる。注入予防は、核酸組成物を投与することに関連する有害反応を低減するように機能し得る。いくつかの実施形態において、注入予防は、核酸組成物を投与する前に、必要な前投薬として投与される。本明細書に記載のコルチコステロイド、注入予防、およびガイドRNA含有組成物の投与量、頻度および投与様式は、独立して制御することができる。【0487】

10

開示される方法で使用されるコルチコステロイドは、当該技術分野で既知のレジメン、例えば、米国FDAが承認したレジメンに従って投与され得る。いくつかの実施形態において、例えば、ヒト対象へのまたはヒト対象において使用するための投与を含め、コルチコステロイドは、約0.75mg~約25mgの範囲の量で投与され得る。いくつかの実施形態において、例えば、ヒト対象へのまたはヒト対象において使用するための投与を含め、コルチコステロイドは、約0.01~0.5mg/kg、例えば、0.1~0.40mg/kgまたは0.25~0.40mg/kgの範囲の量で投与され得る。【0488】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の前に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の後に投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物と同時に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のコルチコステロイドは、ガイドRNA含有組成物の投与の前または後に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のガイドRNA含有組成物は、コルチコステロイドの投与の前または後に投与される。いくつかの実施形態において、複数回用量のコルチコステロイドおよび複数回用量のガイドRNA含有組成物が投与される。【0489】

20

適切な場合、ある用量のコルチコステロイドは、適切な間隔で別々に投与される少なくとも2つのサブ用量として投与され得る。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載されるガイドRNA含有組成物の投与の前に、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、ある用量のコルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与の後に、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、(例えば、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与の前、投与とともに、および/または投与の後に)投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与前に、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の投与後に、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、12時間、18時間、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または前述の値のうちのいずれか2つによって制限される範囲内の時間量で、投与される。【0490】

30

40

50

## 【0490】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも2回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも3回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、少なくとも4回投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、最大5回、6回、7回、8回、9回、または10回投与される。第1の用量は経口であってもよく、第2の用量またはその後の用量は、非経口投与、例えば注入によるものであってもよい。あるいは、第1の用量は、非経口であってもよく、第2の用量またはその後の用量は、経口投与によるものであってもよい。

## 【0491】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の静脈内投与の前に経口投与される。いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、本明細書に記載のガイドRNA含有組成物の静脈内投与時または静脈内投与後に経口投与される。

## 【0492】

いくつかの実施形態において、コルチコステロイドは、デキサメタゾンである。いくつかの実施形態において、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の1~2時間前に静脈内投与される。いくつかの実施形態において、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の1~2時間前に、8~12mg、例えば、10mgの量で静脈内投与される。いくつかの実施形態において、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の8~24時間前に経口投与される。いくつかの実施形態において、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の8~24時間前に、8~12mg、例えば、8mgの量で経口投与される。いくつかの実施形態において、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の8~24時間前に、8~12mg、例えば、8mgの量で経口投与され、デキサメタゾンは、核酸組成物の注入の1~2時間前に、8~12mg、例えば、10mgの量で静脈内投与される。

## 【0493】

## B. 核酸組成物の送達

いくつかの実施形態において、gRNAおよびRNAとしてRNAガイドDNA結合剤をコードする本明細書に記載の核酸を含むか、または1つ以上のベクター上でコードされる、本明細書に記載の核酸組成物は、脂質ナノ粒子で製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、それらの内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる「LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS」という名称のWO2017173054A1、「FORMULATIONS」という名称のWO2019067992A1を参照のこと。対象にヌクレオチドを送達することが可能な当業者に公知の任意の脂質ナノ粒子(LNP)は、本明細書に記載のガイドRNAと、RNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする核酸とともに利用され得る。

## 【0494】

CRISPR/Casカーゴを含む、RNAのためのLNP製剤の様々な実施形態が、本明細書に開示される。かかるLNP製剤は、(i)CCD脂質、例えば、アミン脂質と、(ii)中性脂質と、(iii)ヘルパー脂質と、(iv)ステルス脂質、例えば、PEG脂質とを含み得る。LNP製剤のいくつかの実施形態は、ヘルパー脂質、中性脂質、およびPEG脂質などのステルス脂質とともに、「アミン脂質」を含む。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、1%未満の中性リン脂質を含む。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、0.5%未満の中性リン脂質を含む。「脂質ナノ粒子」によって、分子間力によって互いに物理的に結合する複数の(すなわち、1つを超える)脂質分子を含む粒子を意味する。

## 【0495】

## CCD脂質

CRISPR/Cas mRNAおよびガイドRNA成分を肝臓細胞に送達するための

10

20

30

40

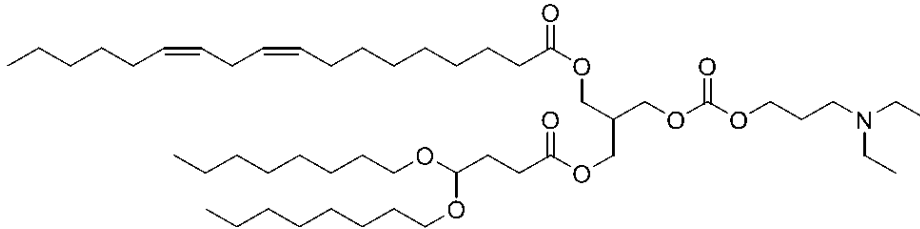
50

脂質組成物は、C C D 脂質を含む。

【0496】

いくつかの実施形態において、C C D 脂質は、3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエノアートとも呼ばれる、(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノアートである脂質Aである。脂質Aは以下のように描写できる。

【化8】



10

【0497】

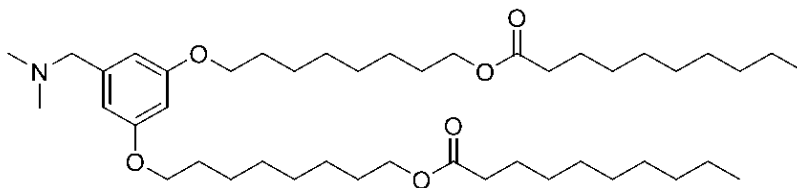
脂質Aは、WO2015/095340（例えば84～86ページ）に従って合成される。

20

【0498】

いくつかの実施形態において、C C D 脂質は、((5-((ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノアート)とも呼ばれる、((5-((ジメチルアミノ)メチル)-1,3-フェニレン)ビス(オキシ))ビス(オクタン-8,1-ジイル)ビス(デカノアート)である脂質Bである。脂質Bは以下のように描写できる。

【化9】



30

【0499】

脂質Bは、WO2014/136086（例えば107～09ページ）に従って合成される。

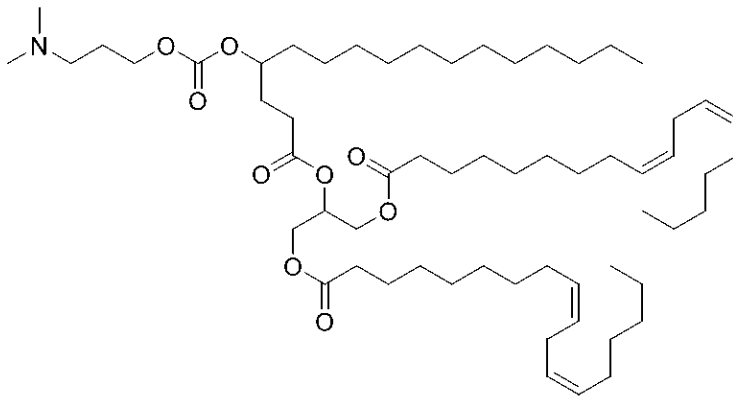
【0500】

いくつかの実施形態において、C C D 脂質は、2-((4-(((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)ヘキサデカノイル)オキシ)プロパン-1,3-ジイル(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-ビス(オクタデカ-9,12-ジエノアート)である脂質Cである。脂質Cは以下のように描写できる。

40

50

## 【化 10】



10

## 【0501】

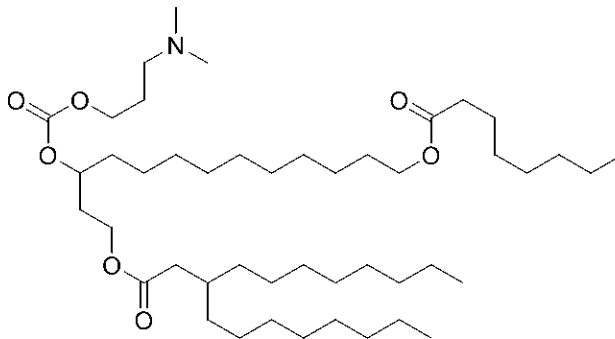
いくつかの実施形態において、CCD脂質は、3-((3-(ジメチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)-13-(オクタノイルオキシ)トリデシル3-オクチルウンデカノアートである脂質Dである。

## 【0502】

脂質Dは以下のように描写できる。

## 【化 11】

20



30

## 【0503】

脂質Cおよび脂質Dは、WO2015/095340に従って合成され得る。

## 【0504】

CCD脂質はまた、脂質A、脂質B、脂質C、または脂質Dに対する等価物であり得る。特定の実施形態において、CCD脂質は、脂質Aに対する等価物、脂質Bに対する等価物、脂質Cに対する等価物、または脂質Dに対する等価物である。

## 【0505】

## アミン脂質

いくつかの実施形態において、生理活性薬剤の送達のためのLNP組成物は、「アミン脂質」を含み、アミン脂質は、脂質A、脂質B、脂質C、脂質D、または脂質Aの等価物（脂質Aのアセタール類似体を含む）、脂質Bの等価物、脂質Cの等価物、および脂質Dの等価物として定義される。

40

## 【0506】

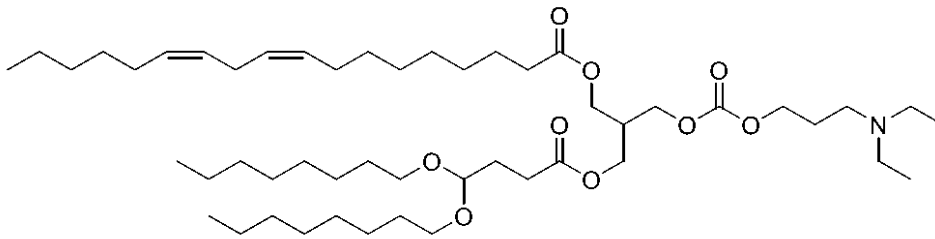
いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Aであり、(9Z, 12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9, 12-ジエノアートであり、3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピル(9Z, 12Z)-オクタデカ-9, 12-ジエノアートとも呼ばれる。脂質Aは以

50



下のように描写できる。

【化12】



【0507】

脂質Aは、WO2015/095340（例えば84～86ページ）に従って合成される。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aに対する等価物である。

【0508】

特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aの類似体である。特定の実施形態において、脂質A類似体は、脂質Aのアセタール類似体である。特定のLNP組成物において、アセタール類似体は、C4～C12アセタール類似体である。いくつかの実施形態において、アセタール類似体は、C5～C12アセタール類似体である。追加の実施形態において、アセタール類似体は、C5～C10アセタール類似体である。さらなる実施形態において、アセタール類似体は、C4、C5、C6、C7、C9、C10、C11、およびC12アセタール類似体から選択される。

【0509】

本明細書に記載のLNPにおける使用に好適なアミン脂質は、インビボで生分解可能であり、生理活性薬剤（例えば、RNA）を細胞に送達するのに適している。アミン脂質は、低い毒性を有する（例えば、10mg/kg以上の量のRNAカーゴで副作用がない動物モデルにおいて許容される）。特定の実施形態において、アミン脂質を含むLNPは、アミン脂質の少なくとも75%が、8、10、12、24、もしくは48時間以内、または3、4、5、6、7、もしくは10日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、アミン脂質を含むLNPは、mRNAまたはgRNAの少なくとも50%が、8、10、12、24、もしくは48時間以内、または3、4、5、6、7、もしくは10日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、アミン脂質を含むLNPは、例えば、脂質（例えば、アミン脂質）、RNA（例えば、mRNA）、または別の構成要素を測定することによって、LNPの少なくとも50%が、8、10、12、24、もしくは48時間以内、または3、4、5、6、7、もしくは10日以内に血漿から除去されるものを含む。特定の実施形態において、LNPの脂質封入されたもの対遊離の脂質、RNA、または核酸成分が測定される。

【0510】

脂質クリアランスは、文献に記載されているように測定されてもよい。Maier, M. A., et al. "Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics," Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78（「Maier」）を参照のこと。例えば、Maierにおいて、ルシフェラーゼを標的とするsiRNAを含むLNP-siRNA系が、6～8週齢の雄C57BL/6マウスに、外側尾静脈を介する静脈内ボラス注射によって、0.3mg/kgで投与された。投与後0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、96、および168時間で、血液、肝臓、および脾臓試料を採取した。組織採取の前にマウスに生理食塩水で灌流させ、血液試料を処理して血漿を得た。すべての試料は、処理され、LC-MSによって分析された。さらに、Maierは、LNP-siRNA製剤の投与後の毒性を評価するための手順を記載している。例えば、ルシフェラーゼを標的とするsiRNAを、雄のSprague-Dawley

y ラットに、5 mL / kg の用量体積で単回静脈内ボラス注射により、0、1、3、5、および 10 mg / kg (5 動物 / 群) で投与した。24 時間後、意識のある動物の頸静脈から約 1 mL の血液が得られ、血清を単離した。投与後 72 時間で、すべての動物を剖検のために安楽死させた。臨床的徴候、体重、血清化学、臓器重量および組織病理の評価を行った。Maier は、siRNA-LNP 製剤を評価するための方法を記載しているが、これらの方法は、本開示の LNP 組成物の投与のクリアランス、薬物動態、および毒性の評価に適用され得る。

#### 【0511】

アミン脂質によって、クリアランス速度が増加し得る。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、脂質クリアランス速度であり、例えば、脂質が血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、RNA クリアランス速度であり、例えば、mRNA または gRNA が血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、LNP が血液、血清、または血漿から除去される速度である。いくつかの実施形態において、クリアランス速度は、LNP が肝臓組織または脾臓組織などの組織から除去される速度である。特定の実施形態において、高いクリアランス速度によって、実質的な有害作用のない安全性プロファイルが得られる。アミン脂質は、循環および組織における LNP 蓄積を減少させ得る。いくつかの実施形態において、循環および組織における LNP 蓄積の減少によって、実質的な有害作用のない安全性プロファイルが得られる。

#### 【0512】

本開示のアミン脂質は、それらが含まれる媒体の pH に応じて電離していてもよい (例えば、塩を形成してもよい)。例えば、わずかに酸性の媒体において、アミン脂質はプロトン化され、したがって正電荷を帯びていてもよい。逆に、例えば、pH がおよそ 7.35 である血液などのわずかに塩基性の媒体では、アミン脂質はプロトン化されず、したがって電荷を帯びていない場合がある。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約 9 の pH でプロトン化されてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約 9 の pH でプロトン化されてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、少なくとも約 10 の pH でプロトン化されてもよい。

#### 【0513】

アミン脂質の大部分がプロトン化される pH は、その固有の pKa に関連する。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約 5.1 ~ 約 7.4 の範囲の pKa を有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約 5.5 ~ 約 6.6 の範囲の pKa を有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約 5.6 ~ 約 6.4 の範囲の pKa を有していてもよい。いくつかの実施形態において、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約 5.8 ~ 約 6.2 の範囲の pKa を有していてもよい。例えば、本開示のアミン脂質は、それぞれ独立して、約 5.8 ~ 約 6.5 の範囲の pKa を有してもよい。約 5.1 ~ 約 7.4 の範囲の pKa を有する陽イオン性脂質が、インビボで、例えば肝臓にカーゴを送達するのに有効であることがわかっているため、LNP を製剤化する際にアミン脂質の pKa が重要な考慮事項となり得る。さらに、約 5.3 ~ 約 6.4 の範囲の pKa を有する陽イオン性脂質が、インビボで、例えば腫瘍に送達するのに有効であることがわかっている。例えば、WO 2014 / 136086 を参照のこと。

#### 【0514】

##### 追加の脂質

本開示の脂質組成物における使用に好適な「中性脂質」としては、例えば、様々な中性、非荷電性、または双性イオン性の脂質を含む。本開示における使用に好適な中性リン脂質の例は、5-ヘプタデシルベンゼン-1,3-ジオール (レゾルシノール)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ポスホコリン (phosphocholine) (DOPC)、ジミリストイル

ホスファチジルコリン (DMPC)、ホスファチジルコリン (PLPC)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DAPC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジラウリロイルホスファチジルコリン (DLPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、1-ミリストイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (MPPC)、1-パルミトイル-2-ミリストイルホスファチジルコリン (PMP)、1-パルミトイル-2-ステアロイルホスファチジルコリン (SPC)、1,2-ジアラキドイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DBPC)、1-ステアロイル-2-パルミトイルホスファチジルコリン (SPPC)、1,2-ジェイコセノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DEPC)、パルミトイルオレイルホスファチジルコリン (POPC)、リソホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジリノレイルホスファチジルコリンジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、パルミトイルロレイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、リソホスファチジルエタノールアミン、およびこれらの組み合わせを含むが、これらには限定されない。一実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、およびジミリストイルホスファチジルエタノールアミン (DMPE) からなる群から選択され得る。別の実施形態において、中性リン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) であり得る。別の実施形態において、中性リン脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) であり得る。

10

20

#### 【0515】

「ヘルパー脂質」には、ステロイド、ステロール、およびアルキルレゾルシノールが含まれる。本開示において使用するのに好適なヘルパー脂質としては、限定されないが、コレステロール、5-ヘプタデシルレゾルシノール、およびヘミコハク酸コレステロールが挙げられる。一実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールであってもよい。一実施形態において、ヘルパー脂質は、ヘミコハク酸コレステロールであってもよい。

#### 【0516】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がインビボ（例えば血管中）で存在し得る時間の長さを变化させる脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒子サイズを制御することによって製剤化プロセスにおいて有用である。本明細書において使用されるステルス脂質は、LNPの薬物動態特性を調節し得る。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質としては、限定されないが、脂質部分に連結した親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられる。本開示の脂質組成物における使用に好適なステルス脂質およびそのような脂質の生化学に関する情報は、Romberg et al., Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71 および Hoekstra et al., Biochimica et Biophysica Acta 1660 (2004) 41-52 の中に見出され得る。追加の好適なPEG脂質は、例えば、WO2006/007712に開示される。

30

#### 【0517】

一実施形態において、ステルス脂質の親水性頭部基は、PEGに基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。ステルス脂質は、脂質部分を含み得る。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG脂質である。PEG脂質は、例えば、粒子凝集を低減し、粒径を制御することによって製剤化プロセスを補助し得る。本明細書において使用されるPEG脂質は、LNPの薬物動態特性を調節し得る。典型的には、PEG脂質は、脂質部分およびPEGに基づくポリマー部分を含む。

40

#### 【0518】

一実施形態において、ステルス脂質は、PEGに基づくポリマー（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）、ポリ（オキサゾリン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（グリセロール）、ポリ（N-ビニルピロリドン）、ポリアミノ酸、およびポリ〔N-（2-ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド〕から選択されるポリマー部分を含む。

50

## 【0519】

一実施形態において、PEG脂質は、PEGに基づくポリマー部分（ポリ（エチレンオキシド）と呼ばれることもある）を含む。

## 【0520】

PEG脂質は、脂質部分をさらに含む。いくつかの実施形態において、脂質部分は、独立して約C4～約C40の飽和もしくは不飽和炭素原子を含むアルキル鎖長を有するジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミド基を含むものを含め、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドに由来していてもよく、鎖は、1つ以上の官能基（例えば、アミドもしくはエステルなど）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、アルキル鎖長は、約C10～C20を含む。ジアルキルグリセロールまたはジアルキルグリカミド基は、1つ以上の置換アルキル基をさらに含み得る。鎖長は、対称でも非対称でもよい。

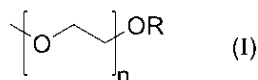
## 【0521】

別に指示されない限り、本明細書において使用される「PEG」という用語は、任意のポリエチレングリコールまたは他のポリアルキレンエーテルポリマーを意味する。一実施形態において、PEGは、任意選択で置換されたエチレングリコールまたはエチレンオキシドの直鎖または分岐鎖のポリマーである。一実施形態において、PEGは非置換である。一実施形態において、PEGは、例えば、1つ以上のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、またはアリアル基によって置換されている。一実施形態において、この用語は、PEG-ポリウレタンまたはPEG-ポリプロピレンなどのPEGコポリマーを含む（例えば、J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)を参照のこと）。別の実施形態において、この用語は、PEGコポリマーを含まない。一実施形態において、PEGは、約130～約50,000、副次的な実施形態において、約150～約30,000、副次的な実施形態において、約150～約20,000、副次的な実施形態において、約150～約15,000、副次的な実施形態において、約150～約10,000、副次的な実施形態において、約150～約6,000、副次的な実施形態において、約150～約5,000、副次的な実施形態において、約150～約4,000、副次的な実施形態において、約150～約3,000、副次的な実施形態において、約300～約3,000、副次的な実施形態において、約1,000～約3,000、副次的な実施形態において、約1,500～約2,500の分子量を有する。

## 【0522】

特定の実施形態において、PEG（例えばステルス脂質などの脂質部分または脂質に共役する）は、「PEG-2K」であり、「PEG2000」とも呼ばれ、これは約2,000ダルトンの平均分子量を有する。PEG-2Kは、本明細書において、以下の式（I）によって表され、式中、nは45であり、この数は、数平均重合度が約45サブユニット

## 【化13】



を含むことを意味する。しかしながら、例えば、数平均重合度が約23サブユニット（ $n = 23$ ）、および／または68サブユニット（ $n = 68$ ）を含む、当該技術分野において公知の他のPEGの実施形態を使用してもよい。いくつかの実施形態において、nは約30～約60の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約35～約55の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約40～約50の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは約42～約48の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、nは45であってもよい。いくつかの実施形態において、Rは、H、置換アルキル、および非置換アルキルから選択され得る。いくつかの実施形態において、Rは非置換アルキルであってもよい。いくつかの実施形態において、Rはメチルであっても

よい。

【0523】

本明細書において記載される実施形態のいずれにおいても、PEG脂質は、PEG-ジラウロイルグリセロール、PEG-ジミリスチルグリセロール (PEG-DMG) (NOF、Tokyo、Japanからカタログ番号GM-020)、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステアロイルグリセロール (PEG-DSPE) (カタログ番号DSPE-020CN、NOF、Tokyo、Japan)、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、およびPEG-ジステアロイルグリカミド、PEG-コレステロール (1-[8'-(コレステ-5-エン-3[ベータ]-オキシ)カルボキシアミド-3', 6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)、PEG-DMB (3, 4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ(エチレングリコール)エーテル)、1, 2-ジミリスチル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DMG)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DSPE) (Avanti Polar Lipids、Alabaster, Alabama, USA製のカタログ番号880120C)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロール、メトキシポリエチレングリコール (PEG2k-DSG、GS-020、NOF Tokyo、Japan)、ポリ(エチレングリコール)-2000-ジメタクリレート (PEG2k-DMA)、および1, 2-ジステアリルオキシプロピル-3-アミン-N-[メトキシ(ポリエチレングリコール)-2000] (PEG2k-DSA) から選択され得る。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGであってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSGであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSPEであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C-DMAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、WO2016/010840 (段落[00240]~[00244]) に開示される化合物S027であってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DSAであってもよい。一実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C11であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C14であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C16であってもよい。いくつかの実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-C18であってもよい。

【0524】

LNP製剤化

LNPは、(i) 封入およびエンドソーム脱出のためのアミン脂質と、(ii) 安定化のための中性脂質と、(iii) これも安定化のためのヘルパー脂質と、(iv) ステルス脂質、例えば、PEG脂質とを含有し得る。中性脂質は、省略されてもよい。

【0525】

いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNAガイドDNA結合剤、CasヌクレアーゼmRNA、クラス2CasヌクレアーゼmRNA、Cas9 mRNA、およびgRNAのうちの1つ以上を含むRNA成分を含み得る。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、RNA成分として、クラス2CasヌクレアーゼをコードするmRNAと、gRNAとを含む。特定の実施形態において、LNP組成物は、RNA成分と、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、ステルス脂質とを含み得る。特定のLNP組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。他の組成物において、中性脂質は、DSPCである。追加の実施形態において、ステルス脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の実施形態において、LNP組成物は、脂質Aまたは脂質Aの等価物と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、ステルス脂質と、ガイドRNAとを含む。特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Aである。特定の組成物において、ア

10

20

30

40

50

ミン脂質は、脂質Aまたはそのアセタール類似体であり、ヘルパー脂質はコレステロールであり、中性脂質はDSPCであり、ステルス脂質はPEG2k-DMGである。

【0526】

特定の実施形態において、脂質組成物は、製剤中の成分の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される。本開示の実施形態は、製剤中の成分の脂質のそれぞれのモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約30mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約40mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約45mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約55mol%～約60mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%～約55mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約50mol%であり得る。一実施形態において、アミン脂質のmol%は、約55mol%であり得る。いくつかの実施形態において、LNPバッチのアミン脂質のmol%は、標的mol%の±30%、±25%、±20%、±15%、±10%、±5%、または±2.5%である。いくつかの実施形態において、LNPバッチのアミン脂質のmol%は、標的mol%の±4mol%、±3mol%、±2mol%、±1.5mol%、±1mol%、±0.5mol%、または±0.25mol%である。すべてのmol%数は、LNP組成物の脂質成分の分率として示される。特定の実施形態において、アミン脂質mol%のLNPのロット間の変動性は、15%未満、10%未満、または5%未満であろう。

10

20

【0527】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%～約15mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約7mol%～約12mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%～約5mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%～約10mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約8mol%～約10mol%であり得る。

30

【0528】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約5mol%、約6mol%、約7mol%、約8mol%、約9mol%、約10mol%、約11mol%、約12mol%、約13mol%、約14mol%、または約15mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約9mol%であり得る。

【0529】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約1mol%～約5mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質のmol%は、約0.1mol%～約1mol%であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0.1mol%、約0.2mol%、約0.5mol%、1mol%、約1.5mol%、約2mol%、約2.5mol%、約3mol%、約3.5mol%、約4mol%、約4.5mol%、または約5mol%であり得る。

40

【0530】

一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約1mol%未満であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0.5mol%未満であり得る。一実施形態において、中性脂質、例えば、中性リン脂質のmol%は、約0mol%、約0.1mol%、約0.2mol%、約0.3mol%、約0.4mol%、約0.5mol%、約0.6mol%、約0.7mol%、約0.8mol%、約0.9mol%、または約1mol%であり得る。いくつかの実施形態に

50

において、本明細書に開示される製剤は、中性脂質を含まない（すなわち、0 mol % の中性脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性脂質を本質的に含まない（すなわち、約 0 mol % の中性脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性リン脂質を含まない（すなわち、0 mol % の中性リン脂質）。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される製剤は、中性リン脂質を本質的に含まない（すなわち、約 0 mol % の中性リン脂質）。

#### 【0531】

いくつかの実施形態において、LNP バッチの中性脂質の mol % は、標的中性脂質の mol % の  $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または  $\pm 2.5\%$  である。特定の実施形態において、LNP のロット間の変動性は、15 % 未満、10 % 未満、または 5 % 未満であろう。

10

#### 【0532】

一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 20 mol % ~ 約 60 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 25 mol % ~ 約 55 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 25 mol % ~ 約 50 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 25 mol % ~ 約 40 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 30 mol % ~ 約 50 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、約 30 mol % ~ 約 40 mol % であり得る。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、脂質成分を 100 mol % にするように、アミン脂質、中性脂質、および PEG 脂質の濃度に基づいて調整される。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、脂質成分を 100 mol % にするように、アミン脂質および PEG 脂質の濃度に基づいて調整される。一実施形態において、ヘルパー脂質の mol % は、脂質成分を少なくとも 99 mol % にするように、アミン脂質および PEG 脂質の濃度に基づいて調整される。いくつかの実施形態において、LNP バッチのヘルパーの mol % は、標的 mol % の  $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または  $\pm 2.5\%$  である。特定の実施形態において、LNP のロット間の変動性は、15 % 未満、10 % 未満、または 5 % 未満であろう。

20

#### 【0533】

一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 1 mol % ~ 約 10 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 2 mol % ~ 約 10 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 2 mol % ~ 約 8 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 2 mol % ~ 約 4 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 2.5 mol % ~ 約 4 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 3 mol % であり得る。一実施形態において、PEG 脂質の mol % は、約 2.5 mol % であり得る。いくつかの実施形態において、LNP バッチの PEG 脂質の mol % は、標的 PEG 脂質の mol % の  $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または  $\pm 2.5\%$  である。特定の実施形態において、LNP のロット間の変動性は、15 % 未満、10 % 未満、または 5 % 未満であろう。

30

#### 【0534】

特定の実施形態において、カーゴは、RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas ヌクレアーゼ、クラス 2 Cas ヌクレアーゼ、もしくは Cas 9）をコードする核酸、および gRNA もしくは gRNA をコードする核酸、または mRNA および gRNA の組み合わせを含む。一実施形態において、LNP 組成物は、脂質 A またはその等価物を含み得る。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質 A である。いくつかの態様において、アミン脂質は、脂質 A 等価物、例えば脂質 A の類似体である。特定の態様において、アミン脂質は、脂質 A のアセタール類似体である。種々の実施形態において、LNP 組成物は、アミン脂質と、中性脂質と、ヘルパー脂質と、PEG 脂質とを含む。特定の実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。特定の実施形態において、中性脂質は、D

40

50

S P Cである。特定の実施形態において、P E G脂質は、P E G 2 k - D M Gである。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、脂質Aと、ヘルパー脂質と、中性脂質と、P E G脂質とを含み得る。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質と、D S P Cと、コレステロールと、P E G脂質とを含む。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、D M Gを含むP E G脂質を含む。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質A、脂質Aのアセタール類似体を含む脂質Aの等価物から選択される。追加の実施形態において、L N P組成物は、脂質Aと、コレステロールと、D S P Cと、P E G 2 k - D M Gとを含む。

#### 【0535】

種々の実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、P E G脂質とを含む。種々の実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性リン脂質と、P E G脂質とを含む。種々の実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびP E G脂質からなる脂質成分を含む。種々の実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、P E G脂質とを含む。特定の実施形態において、L N P組成物は、中性リン脂質などの中性脂質を含まない。種々の実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、およびP E G脂質からなる脂質成分を含む。特定の実施形態において、中性脂質は、D S P C、D P P C、D A P C、D M P C、D O P C、D O P E、およびD S P Eのうちの1つ以上から選択される。特定の実施形態において、中性脂質は、D S P Cである。特定の実施形態において、中性脂質は、D P P Cである。特定の実施形態において、中性脂質は、D A P Cである。特定の実施形態において、中性脂質は、D M P Cである。特定の実施形態において、中性脂質は、D O P Cである。特定の実施形態において、中性脂質は、D O P Eである。特定の実施形態において、中性脂質は、D S P Eである。特定の実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、P E G脂質は、P E G 2 k - D M Gである。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、脂質Aと、ヘルパー脂質と、P E G脂質とを含み得る。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、脂質A、ヘルパー脂質、およびP E G脂質からなる脂質成分を含み得る。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質と、コレステロールと、P E G脂質とを含む。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、コレステロール、およびP E G脂質からなる脂質成分を含む。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、D M Gを含むP E G脂質を含む。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aのアセタール類似体を含む、脂質Aおよび脂質Aの等価物から選択される。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質AのC 5 ~ C 1 2またはC 4 ~ C 1 2アセタール類似体である。追加の実施形態において、L N P組成物は、脂質Aと、コレステロールと、P E G 2 k - D M Gとを含む。

#### 【0536】

本開示の実施形態はまた、封入される核酸のアミン脂質の正に帯電したアミン基(N)と負に帯電したリン酸基(P)との間のモル比に従って記載される脂質組成物を提供する。これは、式 $N/P$ によって数学的に表されてもよい。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびP E G脂質を含む脂質成分と、核酸成分とを含んでいてもよく、 $N/P$ 比は、約3~10である。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、およびP E G脂質を含む脂質成分と、核酸成分とを含んでいてもよく、 $N/P$ 比は、約3~10である。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびヘルパー脂質を含む脂質成分と、R N A成分とを含んでいてもよく、 $N/P$ 比は、約3~10である。いくつかの実施形態において、L N P組成物は、アミン脂質、ヘルパー脂質、およびP E G脂質を含む脂質成分と、R N A成分とを含んでいてもよく、 $N/P$ 比は、約3~10である。一実施形態において、 $N/P$ 比は、約5~7であってもよい。一実施形態において、 $N/P$ 比は、約3~7であってもよい。一実施形態において、 $N/P$ 比は、約4.5~8であってもよい。一実施形態において、 $N/P$ 比は、約6であってもよい。一実

10

20

30

40

50



施形態において、N／P比は、 $6 \pm 1$ であってもよい。一実施形態において、N／P比は、 $6 \pm 0.5$ であってもよい。いくつかの実施形態において、N／P比は、標的N／P比の $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、または $\pm 2.5\%$ である。特定の実施形態において、LNPのロット間の変動性は、 $15\%$ 未満、 $10\%$ 未満、または $5\%$ 未満であろう。

#### 【0537】

いくつかの実施形態において、RNA成分は、核酸、例えば、本明細書に開示される核酸、例えば、本明細書に記載のCasヌクレアーゼ（例えば、本明細書に記載のCas9 mRNA）をコードする核酸と、本明細書に記載のgRNAとを含み得る。いくつかの実施形態において、RNA成分は、本明細書に記載のCasヌクレアーゼ mRNAと、本明細書に記載のgRNAとを含む。いくつかの実施形態において、RNA成分は、本明細書に記載のクラス2 Casヌクレアーゼ mRNAと、本明細書に記載のgRNAとを含む。前述の実施形態のいずれかにおいて、gRNAは、本明細書に記載のsgRNA、例えば、本明細書に記載の化学修飾したsgRNAであり得る。

#### 【0538】

特定の実施形態において、LNP組成物は、上述のRNA成分と、アミン脂質と、ヘルパー脂質と、中性脂質と、PEG脂質とを含み得る。特定のLNP組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールであり、中性脂質は、DSPCであり、かつ／またはPEG脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の組成物において、アミン脂質は、脂質Aおよびその等価物、例えば、脂質Aのアセタール類似体から選択される。一実施形態において、LNP組成物の脂質成分は、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびPEG脂質からなる。一実施形態において、LNP組成物の脂質成分は、アミン脂質、ヘルパー脂質、およびPEG脂質からなる。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含むいくつかの組成物において、中性脂質は、DSPCである。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物は、約 $1\text{mol}\%$ 未満の中性脂質、例えば中性リン脂質を含む。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む特定の組成物は、約 $0.5\text{mol}\%$ 未満の中性脂質、例えば中性リン脂質を含む。特定の実施形態において、LNPは、中性脂質、例えば、中性リン脂質を含まない。CasヌクレアーゼをコードするmRNAおよびgRNAを含む追加の実施形態において、PEG脂質は、PEG2k-DMGまたはPEG2k-C11である。特定の実施形態において、アミン脂質は、脂質Aおよびその等価物、例えば、脂質Aのアセタール類似体から選択される。

#### 【0539】

特定の実施形態において、LNP組成物は、本明細書に記載のCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 Cas mRNA）と、本明細書に記載の少なくとも1つのgRNAとを含む。特定の実施形態において、LNP組成物は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約 $25:1$ ～約 $1:25$ である。特定の実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約 $10:1$ ～約 $1:10$ である。特定の実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 CasヌクレアーゼmRNA）との比が約 $8:1$ ～約 $1:8$ である。本明細書で測定される場合、比は、重量基準である。いくつかの実施形態において、LNP製剤は、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 Cas mRNA）との比が約 $5:1$ ～約 $1:5$ である。いくつかの実施形態において、比の範囲は、約 $3:1$ ～ $1:3$ 、約 $2:1$ ～ $1:2$ 、約 $5:1$ ～ $1:2$ 、約 $5:1$ ～ $1:1$ 、約 $3:1$ ～ $1:2$ 、約 $3:1$ ～ $1:1$ 、約 $3:1$ 、約 $2:1$ ～ $1:1$ である。いくつかの実施形態において、gRNAとmRNAとの比は、約 $3:1$ または約 $2:1$ である。いくつかの実施形態において、gRNAとCasヌクレアーゼmRNA（例えば、クラス2 Casヌクレアーゼ）との比は、約 $1:1$ である。比は、約 $25:1$ 、 $10:1$ 、 $5:1$ 、 $3:1$

、1 : 1、1 : 3、1 : 5、1 : 10、または1 : 25であり得る。

【0540】

いくつかの実施形態において、LNPは、RNA水溶液と有機溶媒系脂質溶液（例えば、100%エタノール）とを混合することによって形成される。好適な溶液または溶媒は、水、PBS、Tris緩衝液、NaCl、クエン酸緩衝液、エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、シクロヘキサン、テトラヒドロフラン、メタノール、イソプロパノールを含むか、またはそれらを含んでもよい。例えば、LNPのインビボ投与のための薬学的に許容される緩衝液を使用してもよい。特定の実施形態において、緩衝液は、LNPを含む組成物のpHをpH6.5以上に維持するために使用される。特定の実施形態において、緩衝液は、LNPを含む組成物のpHをpH7.0以上に維持するために使用される。特定の実施形態において、本組成物は、約7.2～約7.7の範囲のpHを有する。追加の実施形態において、本組成物は、約7.3～約7.7の範囲、または約7.4～約7.6の範囲のpHを有する。さらなる実施形態において、本組成物は、約7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、または7.7のpHを有する。組成物のpHは、マイクロpHプローブで測定されてもよい。特定の実施形態において、凍結保護剤が組成物に含まれる。凍結保護剤の非限定的な例としては、スクロース、トレハロース、グリセロール、DMSO、およびエチレングリコールが挙げられる。例示的な組成物は、例えばスクロースなどの凍結保護剤を最大10%含んでもよい。特定の実施形態において、LNP組成物は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%の凍結保護剤を含んでもよい。特定の実施形態において、LNP組成物は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10%のスクロースを含んでもよい。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、緩衝液を含んでもよい。いくつかの実施形態において、緩衝液は、リン酸緩衝液（PBS）、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液、およびそれらの混合物を含んでもよい。特定の例示的な実施形態において、緩衝液は、NaClを含む。特定の実施形態において、NaClは、省かれる。NaClの例示的な量は、約20mM～約45mMの範囲であってもよい。NaClの例示的な量は、約40mM～約50mMの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、NaClの量は、約45mMである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、Tris緩衝液である。Trisの例示的な量は、約20mM～約60mMの範囲であってもよい。Trisの例示的な量は、約40mM～約60mMの範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、Trisの量は、約50mMである。いくつかの実施形態において、緩衝液は、NaClおよびTrisを含む。LNP組成物の特定の例示的な実施形態は、Tris緩衝液中に5%のスクロースと45mMのNaClを含む。他の例示的な実施形態において、組成物は、約5% w/vの量のスクロースと、約45mMのNaClと、約50mMのTrisをpH7.5で含有する。塩、緩衝液、および凍結保護剤の量は、製剤全体の浸透圧が維持されるように変化させてもよい。例えば、最終浸透圧は、450mOsm/L未満に維持されてもよい。さらなる実施形態において、浸透圧は、350～250mOsm/Lである。特定の実施形態は、300±20mOsm/Lの最終浸透圧を有する。

【0541】

いくつかの実施形態において、マイクロ流体混合、T混合、または交差混合が使用される。特定の態様において、流速、接合部のサイズ、接合部の幾何形状、接合部の形状、管の直径、溶液、および／またはRNAおよび脂質の濃度を変化させてもよい。LNPまたはLNP組成物は、例えば、透析、タンジェンシャルフロー濾過、またはクロマトグラフィーを介して濃縮または精製してもよい。LNPは、例えば、懸濁液、エマルション、または凍結乾燥粉末として保存してもよい。いくつかの実施形態において、LNP組成物は2～8℃で保存され、特定の態様において、LNP組成物は室温で保存される。追加の実施形態において、LNP組成物は、例えば-20℃または-80℃で冷凍保存される。他の実施形態において、LNP組成物は、約0℃～約-80℃の範囲の温度で保存される。凍結LNP組成物は、使用前に、例えば氷上で、室温で、または25℃で解凍してもよい。

【0542】

LNPは、例えば、ミクロスフェア（単層および多層の小胞、例えば、いくつかの実施形態において、実質的に球形であり、より特定の実施形態において、水性コアを含み得る「リポソーム」ラメラ相脂質二重層を含み、例えば、RNA分子の実質的な部分を含む）、エマルション中の分散相、ミセル、または懸濁液中の内相であってよい。

#### 【0543】

さらに、LNP組成物は、治療上有効な用量でインビボにおいて細胞毒性レベルまで蓄積しないという点で生分解性である。いくつかの実施形態において、LNP組成物は、治療用量レベルで実質的な有害作用をもたらす自然免疫応答を引き起こさない。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるLNP組成物は、治療用量レベルで毒性を引き起こさない。

#### 【0544】

いくつかの実施形態において、pdiは、約0.005～約0.75の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0.01～約0.5の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.4の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.35の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.35の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.3の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.25の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0～約0.2の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、pdiは、約0.08、0.1、0.15、0.2、または0.4未満であってもよい。

#### 【0545】

本明細書に開示されるLNPは、サイズ（例えば、Z平均直径）が約1～約250nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約10～約200nmである。さらなる実施形態において、LNPは、サイズが約20～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約100nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約50～約120nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約60～約100nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約150nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約120nmである。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが約75～約100nmである。別に指示されない限り、本明細書で言及されるすべてのサイズは、Malvern Zetasizerでの動的光散乱によって測定されるような、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ（直径）である。ナノ粒子試料は、カウント数がおおよそ200～400kcpとなるように、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈される。データは、強度測定値の加重平均（Z平均直径）として提示される。

#### 【0546】

いくつかの実施形態において、LNPは、約50%～約100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約50%～約70%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約70%～約90%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約90%～約100%の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約75%～約95%の範囲の平均封入効率で形成される。

#### 【0547】

いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^6 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $5.00 \times 10^5 \text{ g/mol}$ ～約 $7.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $1.00 \times 10^7 \text{ g/mol}$ ～約 $1.00 \times 10^9 \text{ g/mol}$

10

20

30

40

50

Lの範囲の平均分子量で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、約 $5.0 \times 10^6 \text{ g/mol}$ ～約 $5.0 \times 10^9 \text{ g/mol}$ の範囲の平均分子量で形成される。  
【0548】

いくつかの実施形態において、多分散性 ( $M_w/M_n$ 、重量平均モル質量 ( $M_w$ ) 対数平均モル質量 ( $M_n$ ) の比) は、約 $1.000$ ～約 $2.000$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $M_w/M_n$ は、約 $1.00$ ～約 $1.500$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $M_w/M_n$ は、約 $1.020$ ～約 $1.400$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $M_w/M_n$ は、約 $1.010$ ～約 $1.100$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $M_w/M_n$ は、約 $1.100$ ～約 $1.350$ の範囲であってもよい。

10

【0549】

本開示のLNPの多分散指数 (「 $pdi$ 」) およびサイズを特性決定するために、動的光散乱 (「DLS」) を使用することができる。DLSは、試料を光源に供した結果として生じる光の散乱を測定する。DLS測定から決定されたPDIは、集合体内の粒径 (平均粒径付近) の分布を表し、完全に均一な集合体のPDIはゼロである。いくつかの実施形態において、 $pdi$ は、 $0.005$ ～ $0.75$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $pdi$ は、 $0.01$ ～ $0.5$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $pdi$ は、 $0.02$ ～ $0.4$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $pdi$ は、 $0.03$ ～ $0.35$ の範囲であってもよい。いくつかの実施形態において、 $pdi$ は、 $0.1$ ～ $0.35$ の範囲であってもよい。

20

【0550】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるLNPは、サイズが $1 \sim 250 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $10 \sim 200 \text{ nm}$ である。さらなる実施形態において、LNPは、サイズが $20 \sim 150 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $50 \sim 150 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $50 \sim 100 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $50 \sim 120 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $75 \sim 150 \text{ nm}$ である。いくつかの実施形態において、LNPは、サイズが $30 \sim 200 \text{ nm}$ である。別に指示されない限り、本明細書で言及されるすべてのサイズは、Malvern Zetasizerでの動的光散乱によって測定されるような、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ (直径) である。ナノ粒子試料は、カウント数がおよそ $200 \sim 400 \text{ kct}$ となるように、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈される。データは、強度測定値の加重平均として提示される。いくつかの実施形態において、LNPは、 $50\% \sim 100\%$ の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、 $50\% \sim 70\%$ の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、 $70\% \sim 90\%$ の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、 $90\% \sim 100\%$ の範囲の平均封入効率で形成される。いくつかの実施形態において、LNPは、 $75\% \sim 95\%$ の範囲の平均封入効率で形成される。

30

【0551】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAおよび本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤 (例えば、Cas9、SpyCas9) をコードする核酸 (例えば、mRNA) と会合するLNPは、ATTRを治療するための医薬の調製において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAおよび本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤 (例えば、Cas9、SpyCas9) をコードする核酸 (例えば、mRNA) と会合するLNPは、ATTRを有する対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維におけるATTRの蓄積および凝集を低減もしくは予防するための医薬の調製において使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるgRNAおよび本明細書に開示されるRNAガイドDNA結合剤 (例えば、Cas9、SpyCas9) をコードする核酸 (例えば、mRNA) と会合するLNPは、血清ATTR濃度を低減するための医薬の調製におい

40

50

て使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される gRNA および本明細書に開示される RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）と会合する LNP は、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類において ATTR を治療するために使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される gRNA および本明細書に開示される RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）と会合する LNP は、ATTR を有する対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類においてアミロイドもしくはアミロイド原線維における TTR の蓄積および凝集を低減もしくは予防するために使用するためのものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される gRNA および本明細書に開示される RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）と会合する LNP は、対象、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトなどの霊長類において血清 TTR 濃度を低減するために使用するためのものである。

10

#### 【0552】

エレクトロポレーションも、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態において、エレクトロポレーションを使用して、本明細書に開示される gRNA および Cas9 などの RNA ガイド DNA ヌクレアーゼまたは Cas9 などの RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸のうちのいずれか 1 つを送達し得る。

20

#### 【0553】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に開示される gRNA および本明細書に開示される RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas9、SpyCas9）をコードする核酸（例えば、mRNA）のうちのいずれか 1 つをエキスポで細胞に送達するための方法であって、gRNA および核酸が LNP と会合している、方法を含む。

#### 【0554】

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のうちのいずれか 1 つ以上を含むガイド RNA のいずれかをコードする DNA または RNA ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ガイド RNA 配列に加えて、ベクターは、ガイド RNA をコードしない核酸をさらに含む。ガイド RNA をコードしない核酸としては、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列、および RNA ガイド DNA ヌクレアーゼ（Cas9 等のヌクレアーゼであってもよい）をコードする核酸が挙げられる。いくつかの実施形態において、ベクターは、crRNA、trRNA、または crRNA および trRNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、sgRNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列と、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸と、を含み、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas ヌクレアーゼ、例えば、Cas9 または Cpf1 であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクターは、crRNA、trRNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列と、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼをコードする核酸と、を含み、RNA ガイド DNA ヌクレアーゼは、Cas タンパク質、例えば、Cas9 であってもよい。一実施形態において、Cas9 は、Streptococcus pyogenes 由来である（すなわち、SpyCas9）。いくつかの実施形態において、crRNA、trRNA、または crRNA および trRNA（sgRNA であってもよい）をコードするヌクレオチド配列は、天然に存在する CRISPR/Cas 系由来の反復配列のすべてまたは一部が隣接するガイド配列を含むか、またはそれらからなる。crRNA、trRNA、または crRNA および trRNA を含むか、またはそれらからなる核酸は、さらにベクター配列を含んでもよく、ここで、ベクター配列は、自然状態では crRNA、trRNA、または crRNA および trRNA とともに見出されない核酸配列を含むか、またはそれらからなる。

30

40

#### 【0555】

50

いくつかの実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、1つのベクター内の非連続核酸によってコードされる。他の実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、連続核酸によってコードされ得る。いくつかの実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、単一の核酸の反対側の鎖によってコードされる。他の実施形態において、c r R N Aおよびt r R N Aは、単一の核酸の同一の鎖によってコードされる。

【0556】

いくつかの実施形態において、ベクターは、環状であってもよい。他の実施形態において、ベクターは直線状であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスカプシド内に封入され得る。非限定的な例示的なベクターは、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、染色体、ミニ染色体、トランスポゾン、ウイルスベクター、および発現ベクターを含む。

【0557】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、その野生型の対応物から遺伝子組換えされていてもよい。例えば、ウイルスベクターは、クローニングを促進するため、またはベクターの1つ以上の特性を変更するようにするため、挿入、欠失、または1つ以上のヌクレオチドの置換を含み得る。このような特性は、パッケージング能力、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組み込み、複製、転写、および翻訳を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスゲノムの一部分は、より大きいサイズを有する外来性配列をパッケージングすることができるように、削除され得る。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、増強した形質導入効率を有し得る。いくつかの実施形態において、宿主におけるウイルスによって誘発される免疫応答は低減され得る。いくつかの実施形態において、宿主ゲノムへのウイルス配列の組み込みを促進するウイルス遺伝子（例えば、インテグレース等）は、ウイルスを非組み込み性になるようにするために変異され得る。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは複製欠損であってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、ベクター上のコード配列の発現を駆動する外来性の転写または翻訳の制御配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ウイルスはヘルパー依存性であってもよい。例えば、増幅しベクターをウイルス粒子にパッケージングするのに必要とされるウイルスの構成要素（例えばウイルスタンパク質）を供給するための1つ以上のヘルパーウイルスを必要とし得る。このような場合、ウイルス構成要素をコードする1つ以上のベクターを含む1つ以上のヘルパー構成要素は、本明細書において記載されるベクター系とともに宿主細胞に導入され得る。他の実施形態において、ウイルスはヘルパーフリーであってもよい。例えば、ウイルスは、一切のヘルパーウイルスなしで増幅し、ベクターをパッケージングすることが可能であってもよい。いくつかの実施形態において、本明細書において記載されるベクター系は、ウイルス増幅およびパッケージングに必要なウイルスの構成要素をもコードすることもできる。

【0558】

非限定的な例示的なウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター（H D A d）、単純ヘルペスウイルス（H S V - 1）ベクター、バクテリオファージT 4、バキュロウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、A A Vベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、A A V 2、A A V 3、A A V 3 B、A A V 5、A A V 6、A A V 6 . 2、A A V 7、A A V r h . 6 4 R 1、A A V h u . 3 7、A A V r h . 8、A A V r h . 3 2 . 3 3、A A V 8、A A V 9、A A V r h 1 0、またはA A V L K 0 3である。他の実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターであってもよい。

【0559】

いくつかの実施形態において、レンチウイルスは非組み込み性であってもよい。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターであってもよい。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、アデノウイルスは、すべてのコードウイルス領域が、5'および3'の末端逆位配列(ITS)から離れており、パッケージングシグナル(「I」)がウイルスから削除されてそのパッケージング能力が増加している、高クローニング能、または「ガットレス」アデノウイルスであってもよい。さらに他の実施形態において、ウイルスベクターは、HSV-1ベクターであってもよい。いくつかの実施形態において、HSV-1に基づいたベクターは、ヘルパー依存性であり、他の実施形態において、それはベクター依存性ではない。例えば、パッケージング配列のみを保持するアンプリコンベクターは、パッケージングのために構造的な構成要素を有するヘルパーウイルスを必要とし、一方で、非必須のウイルス機能を除去した30kb-欠失HSV-1は、ヘルパーウイルスを必要としない。追加の実施形態において、ウイルスベクターは、バクテリオファージT4であってもよい。いくつかの実施形態において、バクテリオファージT4は、ウイルスの頭部が空であるとき、任意の直線状または環状DNAまたはRNA分子をパッケージングすることができる。さらなる実施形態において、ウイルスベクターは、バキュロウイルスベクターであってもよい。なおもさらなる実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターであってもよい。より小さいクローニング能力を有するAAVまたはレンチウイルスベクターを使用する実施形態において、本明細書において開示されるようなベクター系のすべての構成要素を送達するために1つを超えるベクターを使用する必要がある可能性がある。例えば、1つのAAVベクターは、CasヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードする配列を含有していてもよく、一方、第2のAAVベクターは、1つ以上のガイド配列を含有していてもよい。

10

20

#### 【0560】

いくつかの実施形態において、ベクターは、細胞内において1つ以上のコード配列の発現を駆動することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、例えば細菌細胞などの原核生物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、細胞は、例えば酵母、植物、昆虫、または哺乳動物細胞などの真核生物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、哺乳動物細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、げっ歯類細胞であってもよい。いくつかの実施形態において、真核生物細胞は、ヒト細胞であってもよい。異なる種類の細胞における発現を駆動するための好適なプロモーターは、当該技術分野において公知である。いくつかの実施形態において、プロモーターは野生型であってもよい。他の実施形態において、プロモーターは、より効率的または効果的な発現のために修飾されていてもよい。さらに他の実施形態において、プロモーターは短縮されているが、なおもその機能を維持していてもよい。例えば、プロモーターは、ウイルスへのベクターの適切なパッケージングのために、通常の詳細または低減されたサイズを有し得る。

30

#### 【0561】

いくつかの実施形態において、ベクターは、本明細書において記載されるヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、ベクターによってコードされるヌクレアーゼは、Casタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態において、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の1つのコピーを含み得る。他の実施形態において、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の1つを超えるコピーを含み得る。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの転写または翻訳の制御配列へと作動可能に連結されていてもよい。いくつかの実施形態において、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つプロモーターへと作動可能に連結されていてもよい。

40

#### 【0562】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的であってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な構成的プロモーターは、サイトメガロウイルス最初期プロモーター(CMV)、シミアンウイルス(SV40)プロモーター、アデノウイルス主

50

要後期 (MLP) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV) プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) プロモーター、伸長因子  $\alpha$  (EF1a) プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能性フラグメント、または先行するいずれかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、プロモーターは、CMVプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、短縮型CMVプロモーターであってもよい。他の実施形態において、プロモーターは、EF1aプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態において、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを含む。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、Tet-On (登録商標) プロモーター (Clontech) などの、低い基底 (非誘導) 発現レベルを有するものであってよい。

#### 【0563】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓での発現に特異的なプロモーターであってもよい。

#### 【0564】

ベクターは、本明細書において記載されるガイドRNAをコードするヌクレオチド配列をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、ガイドRNAの1つのコピーを含む。他の実施形態において、ベクターは、ガイドRNAの1つより多いコピーを含む。1つより多いガイドRNAを有する実施形態において、ガイドRNAは、それらが非同一であり、異なる標的配列を標的化するようであってもよく、それらが同一の標的配列を標的化する点において同一であってもよい。ベクターが1つより多いガイドRNAを含むいくつかの実施形態において、各ガイドRNAは、RNAガイドDNAヌクレアーゼとの複合体 (例えば、Cas RNP複合体) 内の活性または安定性などの他の異なる特性を有していてもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター、3' UTR、または5' UTRなどの少なくとも1つの転写または翻訳の制御配列に作動可能に連結されていてもよい。一実施形態において、プロモーターは、tRNAプロモーター、例えば、tRNA<sup>Lys</sup>3、またはtRNAキメラであってもよい。Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9、Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35:2620-2628を参照のこと。いくつかの実施形態において、プロモーターは、RNAポリメラーゼIII (PolIII) によって認識され得る。PolIIIプロモーターの非限定的な例は、U6およびH1プロモーターを含む。いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのU6プロモーターに作動可能に連結され得る。他の実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのH1プロモーターへと作動可能に連結され得る。1つより多いガイドRNAを有する実施形態において、発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同一または異なってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAのcrRNAをコードするヌクレオチドおよびガイドRNAのtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のベクター上に提供され得る。いくつかの実施形態において、crRNAをコードするヌクレオチドおよびtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、crRNAおよびtrRNAは単一の転写産物へと転写され得る。例えば、crRNAおよびtrRNAは、二重分子ガイドRNAを形成するように単一の転写産物から加工され得る。あるいは、crRNAおよびtrRNAは、単一分子ガイドRNA (sgRNA) へと転写され得る。他の実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、同一のベクター上のそれらの対応するプロモーターによって駆動され得る。さらに他の実施形態において、crRNAおよびtrRNAは、異なるベクターによってコードされ得る。

#### 【0565】



いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、CasヌクレアーゼなどのRNAガイドDNAヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を含む同一のベクター上に配置され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの発現は、それら自身の対応するプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAの発現は、Casタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの発現を駆動する同一のプロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAおよびCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの転写産物は、単一の転写産物内に含まれてもよい。例えば、ガイドRNAは、Casタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼの転写産物の非翻訳領域(UTR)内にあってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、転写産物の5'UTR内にあってもよい。他の実施形態において、ガイドRNAは、転写産物の3'UTR内にあってもよい。いくつかの実施形態において、転写産物の細胞内半減期は、その3'UTR内にガイドRNAを含み、それによって3'UTRの長さを短縮することによって低減することができる。追加の実施形態において、ガイドRNAは、転写産物のイントロン内にあってもよい。いくつかの実施形態において、ガイドRNAが転写産物から適切にスプライシングされるように、ガイドRNAが内部に位置するイントロンにおいて、好適なスプライス部位が追加され得る。いくつかの実施形態において、一時的に非常に近接した同じベクターからのCasタンパク質などのRNAガイドDNAヌクレアーゼおよびガイドRNAの発現は、CRISPR RNP複合体のより効率的な形成を促進し得る。

#### 【0566】

いくつかの実施形態において、組成物は、ベクター系を含む。いくつかの実施形態において、ベクター系は、1つの単一のベクターを含み得る。他の実施形態において、ベクター系は、2つのベクターを含み得る。追加の実施形態において、ベクター系は3つのベクターを含み得る。異なるガイドRNAが多重化のために使用されるとき、またはガイドRNAの複数のコピーが使用されるとき、ベクター系は、3つを超えるベクターを含み得る。

#### 【0567】

いくつかの実施形態において、ベクター系は、それが標的細胞に送達した後にのみ発現を開始するために、誘導性プロモーターを含み得る。非限定的な例示的な誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを含む。いくつかの実施形態において、誘導性プロモーターは、Tet-On(登録商標)プロモーター(Clontech)などの、低い基底(非誘導)発現レベルを有するものであってよい。

#### 【0568】

追加の実施形態において、ベクター系は、それが特異的な組織に送達した後にのみ発現を開始するために、組織特異的なプロモーターを含み得る。

#### 【0569】

ベクターは、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、または微小胞によって送達され得る。ベクターはまた、脂質ナノ粒子(LNP)によって送達されてもよい。例えば、それらの内容がそれぞれ参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、2017年10月5日に公開され、「LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR CRISPR/CAS COMPONENTS」という名称のWO2017/173054、および2019年4月4日に公開され、「FORMULATIONS」という名称のWO2019067992A1を参照されたい。本明細書に記載されるLNPおよびLNP製剤のうちのいずれも、ガイドを単独で、またはcasヌクレアーゼまたはcasヌクレアーゼをコードする核酸とともに送達するのに好適である。いくつかの実施形態において、RNA成分と脂質成分とを含み、脂質成分が、アミン脂質と、中性脂質と、ヘルパー脂質と、ステルス脂質とを含み、N/P比が約1~10である、LNP組成物が含まれる。

#### 【0570】

場合によっては、脂質成分は、脂質Aまたはそのアセタール類似体と、コレステロールと、DSPCと、PEG-DMGとを含み、N/P比は、約1~10である。いくつかの実施形態において、脂質成分は、約40~60mol%のアミン脂質と、約5~15mol%の中性脂質と、約1.5~10mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3~10である。いくつかの実施形態において、脂質成分は、約50~60mol%のアミン脂質と、約8~10mol%の中性脂質と、約2.5~4mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約3~8である。場合によっては、脂質成分は、約50~60mol%のアミン脂質と、約5~15mol%のDSPCと、約2.5~4mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約3~8である。場合によっては、脂質成分は、48~53mol%の脂質Aと、約8~10mol%のDSPCと、約1.5~10mol%のPEG脂質とを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、3~8±0.2である。

#### 【0571】

いくつかの実施形態において、LNPは、脂質成分を含み、脂質成分は、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなり、脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、LNP組成物のN/P比が、約6である。いくつかの実施形態において、アミン脂質は、脂質Aである。いくつかの実施形態において、中性脂質は、DSPCである。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG脂質である。いくつかの実施形態において、ステルス脂質は、PEG2k-DMGである。いくつかの実施形態において、ヘルパー脂質は、コレステロールである。いくつかの実施形態において、LNPは、脂質成分を含み、脂質成分は、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、脂質成分の残りが、コレステロールであり、LNP組成物のN/P比が、約6である。

#### 【0572】

いくつかの実施形態において、ベクターは、全身的に送達され得る。いくつかの実施形態において、ベクターは、肝循環に送達され得る。

#### 【0573】

この説明および例示的な実施形態は、限定として解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求の範囲において、別に指示されない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用される量、パーセンテージ、または割合、および他の数値を表すすべての数字は、どの場合においても用語「約」によって、まだそれほど非修飾である範囲により修飾されていると理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。非常に少なくとも、および均等論の適用の特許請求の範囲に限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数を考慮して、通常の丸め手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

#### 【0574】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「a」、「an」、および「the」、および任意の単語の単数形の使用は、明示的かつ明確に1つの指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を含めることに留意されたい。本明細書で 사용되는「含める(include)」という用語およびその文法上の変形は、リスト内のアイテムの列挙が、リストされたアイテムに置換または追加できる他の同様のアイテムを除外しないように、非限定的であることを意図している。

#### 【実施例】

#### 【0575】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲

10

20

30

40

50

を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

#### 【0576】

一般的な試薬および方法

別に指示されない限り、mRNAを、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写（IVT）によって合成した。転写は、一般に、T7プロモーター、配列番号243（配列番号204のRNA ORFをコードする）などの本明細書に開示される転写配列、およびプラスミドにコードされるポリAテール（配列番号263）を含む構築物から行われた。

#### 【0577】

すべての方法について、転写産物濃度を、260nm（Nanodrop）での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をBioanalyzer（Agilent）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

#### 【0578】

LNP製剤化

脂質成分を、以下に記載される脂質成分モル比で100%エタノールに溶解した。化学修飾したsgRNAおよびCas9 mRNAを組み合わせ、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、pH5.0に溶解し、およそ0.45mg/mLの全RNAカーゴ濃度を得た。LNPを、約6のN/P比で、以下に記載されるように、1:2 w/w比での化学修飾したsgRNA:Cas9 mRNAの比で、製剤化した。別に指示されない限り、LNPを、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGで製剤化した。

#### 【0579】

エタノール中の脂質と、2体積部のRNA溶液と、1体積部の水とを衝突噴流混合することによって、LNPを形成した。エタノール中の脂質を、交差混合により、2体積部のRNA溶液と混合する。第4の水の流れを、インラインティーを通る交差の出力流と混合する。（例えば、WO2016/010840、図2を参照のこと）。差圧式流量を使用して混合する間、水性溶媒と有機溶媒の2:1の比を維持した。LNPを室温で1時間保持し、さらに水で希釈した（およそ1:1 v/v）。希釈したLNPを、フラットシートカートリッジ（Sartorius、100kD MWCO）上でタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、次いで、透析濾過により、50mMのTris、45mMのNaCl、5%（w/v）のスクロース、pH7.5（TSS）へと緩衝液を交換した。次いで、得られた混合物を0.2μmの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで4℃または-80℃で保存した。

#### 【0580】

LNP組成分析

本開示のLNPの多分散指数（「pdi」）およびサイズを特性決定するために、動的光散乱（「DLS」）を使用する。DLSは、試料を光源に供した結果として生じる光の散乱を測定する。DLS測定から決定されたPDIは、集合体内の粒径（平均粒径付近）の分布を表し、完全に均一な集合体のPDIはゼロである。

#### 【0581】

電気泳動光散乱を使用して、指定のpHでのLNPの表面電荷を特性決定する。表面電荷、すなわちゼータ電位は、LNP懸濁液中の粒子間の静電反発/引力の大きさの尺度である。

#### 【0582】

非対称フローフィールドフローフラクシオネーション-マルチアングル光散乱（AF4-MALS）を使用して、流体力学的半径によって組成物内の粒子を分離させた後、分画された粒子の分子量、流体力学半径、および二乗平均平方根半径を測定する。これにより、分子量および粒度分布、ならびにBurchard-Stockmeyer Plot（粒子の内部コア密度を示唆する時間経過に伴う流体力学半径に対する二乗平均平方根（「rms」）半径の比）、およびrmsコンフォメーションプロット（分子量のlogに

10

20

30

40

50

対するrms半径のlog、得られる線形フィッティングの傾きが、伸長性に対する圧縮性の程度を与える)などの二次的特徴を評価することが可能になる。

【0583】

ナノ粒子トラッキング分析(NTA、Malvern Nanosight)を使用して、粒度分布および粒子濃度を決定することができる。LNP試料を適切に希釈し、顕微鏡スライドに注入する。粒子が視野を通過してゆっくりと注がれるときに、カメラにより散乱光を記録する。動画をキャプチャした後、ナノ粒子トラッキング分析により、ピクセルをトラッキングし、拡散係数を計算することによって動画を処理する。この拡散係数は、粒子の流体力学半径に変換することができる。また、この装置により、分析で計数された個々の粒子の数を計数し、粒子濃度を得る。

10

【0584】

低温電子顕微鏡(cryo-EM)を使用して、LNPの粒径、形態、および構造特性を決定することができる。

【0585】

LNPの脂質組成分析は、液体クロマトグラフィーと、それに続く帯電エアロゾル検出(LC-CAD)から決定することができる。この分析により、実際の脂質含有量と理論上の脂質含有量との比較を提供することができる。

【0586】

LNP組成物は、平均粒径、多分散指数(pdi)、全RNA含有量、RNAの封入効率、およびゼータ電位について分析される。LNP組成物は、脂質分析、AF4-MALS、NTA、および/またはcryo-EMによってさらに特性決定され得る。平均粒径および多分散性は、Malvern Zetasizer DLS装置を使用した動的光散乱(DLS)によって測定される。LNP試料をPBS緩衝液で希釈した後、DLSにより測定した。平均粒径の強度に基づく測定であるZ平均直径を、数平均直径およびpdiとともに報告する。Malvern Zetasizer装置も、LNPのゼータ電位を測定するために使用される。試料は、測定前にpH7.4の0.1×PBSで1:17に(50μLを800μLに)希釈する。

20

【0587】

蛍光に基づくアッセイ(Ribogreen(登録商標)、ThermoFisher Scientific)を使用して、全RNA濃度および遊離RNAを決定する。封入効率を、(全RNA-遊離RNA)/全RNAとして計算する。LNP試料は、0.2%のTriton-X100を含む1×TE緩衝液で適切に希釈して全RNAを決定するか、1×TE緩衝液で遊離RNAを決定する。標準曲線を、組成物の作製に使用した開始RNA溶液を利用することによって作成し、1×TE緩衝液±0.2%のTriton-X100で希釈する。次に、Diluted Ribogreen(登録商標)色素(製造業者の使用説明書に従う)を標準物および試料の各々に添加して、遮光状態で、室温でおよそ10分間インキュベートする。SpectraMax M5 Microplate Reader(Molecular Devices)を使用して、励起波長、自動カットオフ波長、および発光波長をそれぞれ488nm、515nm、および525nmに設定して試料を読み取る。全RNAおよび遊離RNAを、適切な標準曲線から決定する。

30

40

【0588】

封入効率を、(全RNA-遊離RNA)/全RNAとして計算する。DNA由来のカーゴ成分の封入効率を決定するために同じ手順を使用してもよい。蛍光に基づくアッセイでは、一本鎖DNAの場合はOligreen Dyeを使用してもよく、二本鎖DNAの場合はPicogreen Dyeを使用してもよい。あるいは、全RNA濃度は、逆相イオン対形成(RP-IP)HPLC法によって決定することができる。Triton-X-100を使用してLNPを破壊し、RNAを放出する。次いで、RP-IP HPLCによって、脂質成分からクロマトグラフィーによってRNAを分離し、260nmでのUV吸光度を使用して、標準曲線に対して定量化する。

【0589】

50

A F 4 - M A L S を使用して、分子量および粒度分布、ならびにそれらの計算からの二次統計を調べる。L N P を必要に応じて希釈し、H P L C オートサンプラーを使用して A F 4 分離チャンネルに注入し、これらを集束させ、次いで、チャンネルを横切るクロスフローにおいて、指数関数的勾配で溶出させる。すべての流体は、H P L C ポンプおよび W y a t t E c l i p s e I n s t r u m e n t によって駆動される。A F 4 チャンネルから溶出する粒子は、U V 検出器、マルチアングル光散乱検出器、準弾性光散乱検出器、および示差屈折率検出器を通過する。生データを、D e b e y e モデルを使用することによって処理して、検出器信号から分子量および r m s 半径を決定する。

#### 【0590】

L N P の脂質成分を、帯電エアロゾル検出器 (C A D) に接続した H P L C によって定量的に分析する。4 つの脂質成分のクロマトグラフィー分離を逆相 H P L C によって達成する。C A D は、すべての不揮発性化合物を検出する破壊質量系検出器であり、分析対象物の構造に関係なく信号は一貫している。

#### 【0591】

##### C a s 9 m R N A および g R N A カーゴ

C a s 9 m R N A カーゴを、インビトロ転写によって調製した。キャップされたポリアデニル化 C a s 9 m R N A を、以下のような方法を使用して、線状プラスミド DNA テンプレートおよび T 7 R N A ポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。T 7 プロモーターおよび 9 0 ~ 1 0 0 n t ポリ (A / T) 領域を含有するプラスミド DNA を、2 0 0 n g /  $\mu$  L のプラスミド、2 U /  $\mu$  L の X b a I (N E B)、および 1 x 反応緩衝液の条件で、X b a I とともに 3 7 ° C で 2 時間インキュベートすることによって線状化する。X b a I を、反応物を 6 5 ° C で 2 0 分間加熱することによって不活性化する。線状プラスミドを、酵素および緩衝塩から精製する。C a s 9 修飾 m R N A を生成するための I V T 反応を、以下の条件下、3 7 ° C で 1 . 5 ~ 4 時間インキュベートすることによって行う。5 0 n g /  $\mu$  L の線状プラスミド、G T P、A T P、C T P、および N 1 - メチルシュード U T P (T r i l i n k) の各々、2 ~ 5 m M、1 0 ~ 2 5 m M の A R C A (T r i l i n k)、5 U /  $\mu$  L の T 7 R N A ポリメラーゼ (N E B)、1 U /  $\mu$  L のマウス R N a s e 阻害剤 (N E B)、0 . 0 0 4 U /  $\mu$  L の無機 E . c o l i ピロホスファターゼ (N E B)、ならびに 1 x 反応緩衝液。T U R B O D N a s e (T h e r m o F i s h e r) を、最終濃度が 0 . 0 1 U /  $\mu$  L になるように添加し、反応物をさらに 3 0 分間インキュベートして、DNA テンプレートを除去する。C a s 9 m R N A を、T F F および / または L i C l 沈殿を含む方法で精製した。

#### 【0592】

以下の実施例の s g R N A を、ホスホラミダイトを使用して既知の方法によって化学的に合成した。

#### 【0593】

##### L N P によるインビトロでの C a s 9 m R N A およびガイド R N A の送達

初代ヒト肝臓肝細胞 (P H H) (G i b c o) ならびに初代カニクイザル肝臓肝細胞 (P C H) (I n V i t r o A d m e t L a b o r o t o r i e s) を解凍し、追加物質 (G i b c o、カタログ C M 7 5 0 0) を含む肝細胞解凍培地に再懸濁させ、次いで、遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を、肝細胞プレーティング培地および追加物質パック (I n v i t r o g e n、カタログ番号 A 1 2 1 7 6 0 1 および C M 3 0 0 0) に再懸濁させた。細胞を計数し、P H H については 3 3 , 0 0 0 細胞 / ウェル、P C H については 5 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で B i o - c o a t c o l l a g e n I でコーティングした 9 6 ウェルプレート (T h e r m o F i s h e r、カタログ番号 8 7 7 2 7 2) 上にプレーティングした。プレーティングした細胞を、3 7 ° C および 5 % C O 2 雰囲気での組織培養インキュベーター中で 5 時間放置し、接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について調べ、肝細胞培養培地 (I n v i t r o g e n、カタログ番号 A 1 2 1 7 6 0 1 および C M 4 0 0 0) で 1 回洗浄した。

#### 【0594】

PHHおよびPCHを、以下にさらに記載されるように、LNPで処理した。LNPで処理する前に、細胞株を37℃、5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。LNPを、3%カニクイザル血清または3%ウシ胎児血清を含む培地中、37℃で5分間インキュベートし、本明細書でさらに提供される量で細胞に投与した。

【0595】

#### ゲノムDNA単離

処理した細胞を、処理後72時間で採取した。細胞を、96ウェルプレートの各ウェルから、50μL/ウェルのQuick Extract DNA Extraction溶液（Episentre、カタログQE09050）を使用して、製造業者のプロトコルに従って溶解させた。すべてのDNA試料に対し、本明細書に記載されるように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

【0596】

#### NGSシーケンシング

簡単に述べると、ゲノム中の標的位置での編集効率を定量的に決定するために、ゲノムDNAが単離され、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を同定した。

【0597】

標的部位（例えば、TTR）の周りのPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造業者（Illumina）のプロトコルに従って追加のPCRを実施した。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有するものを除外した後に、リードを適切な参照ゲノム（例えば、hg38、macFas5）とアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム（BAMファイル）にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、もしくは欠失を含むリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

【0598】

編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」および「編集パーセント」）は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入もしくは欠失を有する配列リードの総数として定義される。

【0599】

実施例1－初代肝細胞におけるCas9 mRNAのLNP送達による用量応答

様々なガイドおよびmRNAの組み合わせの有効性を、初代カニクイザル肝細胞（PCH）および初代ヒト肝細胞（PHH）においてインビトロで評価した。PHHおよびPCH細胞を上述のようにプレーティングし、次いで、表8および9にそれぞれ記載されるように様々な用量のLNPで処理した。LNPは、mRNAとしてG000502（配列番号114）と、mRNA000001（配列番号1）またはmRNA000042（配列番号377）のいずれかと含有していた。72時間後に細胞を溶解し、編集%をNGSにより決定した。各状態を3回に分けてアッセイし、表8および9は、編集%についての平均および標準偏差を示す。

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8. P H Hにおける L N P 送達を使用したインビトロ編集

| ガイドID         | mRNA     | C a s 9 mRN<br>Aの用量 (n g) | 編集%の平均   | S D    |
|---------------|----------|---------------------------|----------|--------|
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 5 0                       | 4 6. 1   | 3. 9 7 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 1 0                       | 3 2. 3 7 | 2. 6 4 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 5                         | 2 4. 8 7 | 0. 0 6 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 1                         | 5. 2     | 0. 7 5 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 0. 0 1                    | 0. 4 3   | 0. 1 2 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 0                         | 0. 2 3   | 0. 1 5 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 5 0                       | 4 2. 2 7 | 1. 8   |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 1 0                       | 4 1. 6 7 | 0. 8 1 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 5                         | 3 2. 7   | 2. 9 3 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 1                         | 1 0. 1 3 | 1. 6 2 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 0. 0 1                    | 0. 8     | 0      |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 0                         | 0. 1 3   | 0. 0 6 |

10

## 【表 9】

表 9. P C Hにおける L N P 送達を使用したインビトロ編集

| ガイドID         | mRNA ID  | C a s 9 mRN<br>Aの用量 (n g) | インデル%の<br>平均 | S D    |
|---------------|----------|---------------------------|--------------|--------|
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 5 0                       | 7 1. 8       | 1. 9 9 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 1 0                       | 3 3. 2 3     | 2. 3 2 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 5                         | 1 5. 2 3     | 1. 3 6 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 1                         | 1. 2 7       | 0. 1 2 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 0. 0 1                    | 0. 1         | 0      |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 0 1 | 0                         | 0. 1         | 0      |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 5 0                       | 8 2. 8       | 1. 7 7 |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 1 0                       | 5 9. 5       | 1. 1   |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 5                         | 3 8. 3 7     | 1      |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 1                         | 5. 6         | 0. 4   |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 0. 0 1                    | 0. 3         | 0. 1   |
| G 0 0 0 5 0 2 | mRNA 4 2 | 0                         | 0. 1         | 0      |

20

30

## 【0 6 0 0】

## 実施例 2－初代肝細胞における C a s 9 mRNA の L N P 送達による用量応答

P C H および P H H 細胞において、様々なガイドおよび mRNA の組み合わせをインビトロで評価した。2 名のドナー由来の P H H 細胞と、P C H 細胞を、上述のようにプレティングし、表 1 0 および 1 1 にそれぞれ記載される用量の L N P で処理した。L N P は、C a s 9 mRNA 0 0 0 0 4 2 (配列番号 3 7 7) と、4 つのシングルガイド RNA のうちの 1 つとを含有していた。ガイド G 0 0 0 4 8 0 および G 0 0 0 4 8 6 (配列番号 8 7 および 9 3) は、ヒト T T R 遺伝子を完全に標的とする。ガイド G 0 0 0 5 0 2 (配列番号 1 1 4) は、標的化領域内で単一のミスマッチを有するヒト T T R 遺伝子を標的とする。G 0 0 0 7 3 9 (配列番号 2) は、陰性対照である。7 2 時間後に細胞を溶解し、編集%を N G S により決定した。各条件を 3 回に分けてアッセイした。表 1 0 および 図 1 は、P H H 細胞における編集%の結果を示す。表 1 1 および 図 2 は、P C H 細胞における編集%の結果を示す。

40

50

【表 10-1】

表 10-PHH細胞におけるインビトロ編集

| ガイド         | ガイド濃度<br>(nM) | PHH-ドナー1 |      | PHH-ドナー2 |      |
|-------------|---------------|----------|------|----------|------|
|             |               | 編集%の平均   | 標準偏差 | 編集%の平均   | 標準偏差 |
| G000<br>480 | 15.517<br>24  | 90.97    | 0.91 | 90.33    | 1.71 |
| G000<br>480 | 5.1724<br>14  | 92.23    | 0.85 | 87.57    | 3.63 |
| G000<br>480 | 1.7241<br>38  | 90.83    | 0.68 | 86.37    | 1.50 |
| G000<br>480 | 0.5747<br>13  | 85.37    | 1.86 | 80.53    | 1.97 |
| G000<br>480 | 0.1915<br>71  | 73.53    | 0.91 | 62.37    | 5.98 |
| G000<br>480 | 0.0638<br>57  | 51.57    | 0.40 | 32.80    | 3.10 |
| G000<br>480 | 0.0212<br>86  | 25.37    | 1.48 | 9.07     | 0.67 |
| G000<br>480 | 0.0070<br>95  | 7.23     | 0.40 | 1.97     | 0.57 |
| G000<br>486 | 15.517<br>24  | 79.07    | 0.74 | 86.73    | 1.63 |
| G000<br>486 | 5.1724<br>14  | 82.83    | 1.69 | 88.03    | 2.69 |
| G000<br>486 | 1.7241<br>38  | 71.87    | 0.67 | 81.43    | 1.68 |
| G000<br>486 | 0.5747<br>13  | 54.33    | 0.32 | 66.90    | 2.10 |
| G000<br>486 | 0.1915<br>71  | 33.70    | 1.06 | 41.70    | 2.52 |
| G000<br>486 | 0.0638<br>57  | 16.67    | 0.67 | 17.33    | 1.29 |
| G000<br>486 | 0.0212<br>86  | 5.10     | 0.26 | 4.27     | 0.76 |
| G000<br>486 | 0.0070<br>95  | 1.33     | 0.06 | 1.37     | 0.15 |

10

20

30

40

50



【表 10 - 2】

|         |             |           |         |           |         |
|---------|-------------|-----------|---------|-----------|---------|
| G 0 0 0 | 1 5 . 5 1 7 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 2 4         | 6 8 . 9 3 | 0 . 9 0 | 7 8 . 2 0 | 0 . 1 7 |
| G 0 0 0 | 5 . 1 7 2 4 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 1 4         | 7 2 . 9 0 | 0 . 5 3 | 8 0 . 7 3 | 1 . 7 0 |
| G 0 0 0 | 1 . 7 2 4 1 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 3 8         | 5 3 . 8 3 | 0 . 7 1 | 6 5 . 1 3 | 0 . 7 1 |
| G 0 0 0 | 0 . 5 7 4 7 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 1 3         | 3 1 . 2 3 | 1 . 3 3 | 3 7 . 5 3 | 0 . 8 4 |
| G 0 0 0 | 0 . 1 9 1 5 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 7 1         | 1 4 . 1 7 | 0 . 9 8 | 1 7 . 7 0 | 1 . 7 1 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 6 3 8 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 5 7         | 5 . 0 3   | 0 . 3 2 | 5 . 2 7   | 0 . 1 2 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 2 1 2 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 8 6         | 1 . 5 7   | 0 . 3 1 | 1 . 1 3   | 0 . 3 5 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 0 7 0 |           |         |           |         |
| 5 0 2   | 9 5         | 0 . 3 3   | 0 . 0 6 | 0 . 3 3   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 | 1 5 . 5 1 7 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 2 4         | 0 . 4 7   | 0 . 0 6 | 0 . 2 0   | 0 . 1 0 |
| G 0 0 0 | 5 . 1 7 2 4 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 1 4         | 0 . 4 0   | 0 . 1 0 | 0 . 2 0   | 0 . 1 0 |
| G 0 0 0 | 1 . 7 2 4 1 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 3 8         | 0 . 1 3   | 0 . 0 6 | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 | 0 . 5 7 4 7 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 1 3         | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 | 0 . 1 9 1 5 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 7 1         | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 6 3 8 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 5 7         | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 2 1 2 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 8 6         | 0 . 0 3   | 0 . 0 6 | 0 . 0 7   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 | 0 . 0 0 7 0 |           |         |           |         |
| 7 3 9   | 9 5         | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 | 0 . 0 3   | 0 . 0 6 |

10

20

30

40

50

## 【表 1 1 - 1】

表 1 1 - P C H細胞におけるインビトロ編集

| ガイド              | ガイド濃度<br>(nM)      | 編集%の平均    | 標準偏差    |
|------------------|--------------------|-----------|---------|
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 1 5 . 5 1<br>7 2 4 | 8 . 8 7   | 1 . 2 9 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 5 . 1 7 2<br>4 1 4 | 4 . 4 3   | 0 . 7 1 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 1 . 7 2 4<br>1 3 8 | 0 . 8 0   | 0 . 2 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 0 . 5 7 4<br>7 1 3 | 0 . 2 3   | 0 . 1 2 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 0 . 1 9 1<br>5 7 1 | 0 . 2 3   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 0 . 0 6 3<br>8 5 7 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 0 . 0 2 1<br>2 8 6 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 0 | 0 . 0 0 7<br>0 9 5 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 1 5 . 5 1<br>7 2 4 | 7 3 . 1 0 | 2 . 0 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 5 . 1 7 2<br>4 1 4 | 5 8 . 2 7 | 0 . 4 7 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 1 . 7 2 4<br>1 3 8 | 2 3 . 2 3 | 1 . 4 0 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 0 . 5 7 4<br>7 1 3 | 5 . 9 3   | 0 . 2 5 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 0 . 1 9 1<br>5 7 1 | 1 . 4 3   | 0 . 2 1 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 0 . 0 6 3<br>8 5 7 | 0 . 5 3   | 0 . 1 5 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 0 . 0 2 1<br>2 8 6 | 0 . 4 0   | 0 . 1 7 |
| G 0 0 0 4<br>8 6 | 0 . 0 0 7<br>0 9 5 | 0 . 4 7   | 0 . 1 2 |

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

|                  |                    |           |         |
|------------------|--------------------|-----------|---------|
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 1 5 . 5 1<br>7 2 4 | 8 8 . 1 0 | 0 . 5 3 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 5 . 1 7 2<br>4 1 4 | 8 3 . 5 3 | 0 . 5 5 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 1 . 7 2 4<br>1 3 8 | 7 3 . 0 7 | 2 . 6 8 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 0 . 5 7 4<br>7 1 3 | 4 7 . 8 7 | 1 . 3 8 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 0 . 1 9 1<br>5 7 1 | 1 8 . 3 7 | 0 . 8 6 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 0 . 0 6 3<br>8 5 7 | 4 . 8 0   | 0 . 2 6 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 0 . 0 2 1<br>2 8 6 | 1 . 2 7   | 0 . 5 0 |
| G 0 0 0 5<br>0 2 | 0 . 0 0 7<br>0 9 5 | 0 . 5 7   | 0 . 1 2 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 1 5 . 5 1<br>7 2 4 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 5 . 1 7 2<br>4 1 4 | 0 . 1 3   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 1 . 7 2 4<br>1 3 8 | 0 . 1 3   | 0 . 0 6 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 0 . 5 7 4<br>7 1 3 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 0 . 1 9 1<br>5 7 1 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 0 . 0 6 3<br>8 5 7 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 0 . 0 2 1<br>2 8 6 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |
| G 0 0 0 7<br>3 9 | 0 . 0 0 7<br>0 9 5 | 0 . 1 0   | 0 . 0 0 |

10

20

30

## 【0 6 0 1】

## 実施例 3 - 追加の mRNA の特性決定

本実施例の材料および方法は、2018年9月28日に出願された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 1 8 / 0 5 3 4 3 9 号に記載されている通りであった。異なるコドンスキームを使用する Cas 9 配列を、改善されたタンパク質発現を試験するように設計した。各配列を、別個のコドンセットを使用して、配列番号 203 の Cas 9 アミノ酸をコードするように設計した。各オープンリーディングフレーム配列において、単一のコドンを使用して、各アミノ酸をコードした。配列は、NCBI - GenBank Flat File Release 160.0 (Nakamura et al. (2000) Nucl. Acids Res. 28, 292, Benson et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34 (Database issue), D16-20) に基づく Homo sapiens における完全なタンパク質コード遺伝子内に生じるコドンの頻度と、コドンの中の特定のヌクレオチドの存在量に基づいて変動する。表 5 に示されるコドンスキームに基づいて、配列番号 203 の Cas 9 タンパク質をコードする、Cas 9 のためのいくつかの異なるオープンリーディングフレーム（配列番号 252、311、および 312）を構築した。これらを、HSD 5' UTR（配列番号 241）、アルブミン 3' UTR、T7 プロモーター、およびポリ A テールも含有する構築物に組み込んだ。アルブミン 3' UTR およびポリ A テールを含有する例示的な配列は、配列番号 253 であり

40

50

、3' UTRおよびポリAテールは、配列番号252のHSD 5' UTRおよびORFに続く。

#### 【0602】

ウリジンの代わりに100%のN1-メチルシュードウリジンを使用して、IVTによって各構築物についてメッセンジャーRNAを作製した。Hep G2細胞を、Lipofectamine (商標) MessengerMAX (商標) Transfection Reagent (ThermoFisher) を使用して、800 ngの各々のCas9 mRNAでトランスフェクトした。トランスフェクションから6時間後、細胞を凍結解凍によって溶解させ、遠心分離によって透明化した。ELISAアッセイにより、Cas9タンパク質レベルを決定した。簡潔に述べると、総タンパク質濃度は、ビシンコニン酸アッセイによって決定された。MSD GOLD 96-ウェルStreptavidin SECTOR Plate (Meso Scale Diagnostics、カタログL15SA-1) を、Cas9マウス抗体 (Origene、カタログCF811179) を捕捉抗体として、かつCas9 (7A9-3A3) マウスmAb (Cell Signaling Technology、カタログ14697) を検出抗体として使用して、製造業者のプロトコルに従って調製した。組換えCas9タンパク質を、1X Halt (商標) Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (ThermoFisher、カタログ78437) を使用し、Diluent 39 (Meso Scale Diagnostics) 中の校正標準として使用した。ELISAプレートを、Meso Quickplex SQ120装置 (Meso Scale Discovery) を使用して読み取り、Discovery Workbench 4.0ソフトウェアパッケージ (Meso Scale Discovery) を用いてデータを分析した。

#### 【0603】

トランスサイレチン (TTR) を標的とするガイド (G502、配列番号114) とともにmRNAをHep G2細胞にトランスフェクションし、編集パーセントを測定することにより、インビトロで編集効率を評価した。表12に示される配列番号を含むCas9 mRNAを、3 ng~100 ngのmRNA濃度で評価した。未処理の細胞は、測定可能な編集を示さなかった。表12は、インビトロでのCas9タンパク質発現および編集に対する異なるコドンセットの効果を示す。

#### 【表12】

表12. 異なるコドンセットを有するORFのインビトロでの編集および発現

| ORF (コドンセット)     | ng Cas9 / mg 総タンパク質 | ng Cas9 / mg 総タンパク質の標準偏差 | 編集% (30 ngのトランスフェクトされたmRNA) | 編集の標準偏差 |
|------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| 配列番号252 (表4低U1)  | 31.23               | 4.47                     | 22.2                        | 2.83    |
| 配列番号311 (表4低A)   | 74.62               | 15.53                    | 41.3                        | 3.56    |
| 配列番号312 (表4低A/U) | 77.32               | 10.60                    | 34.8                        | 7.32    |

#### 【0604】

インビボでのコドンスキームの有効性を決定するために、Cas9タンパク質発現を、表4に記載のコドンスキームを使用して、Cas9をコードするmRNAからインビボで発現する場合に測定した。表26に示されるメッセンジャーRNAを、TTRを標的とするガイドRNA (G282、配列番号242) を有するLNPとして製剤化した。LNPは、クロスフロー手順を使用して組み立てられ、それぞれ、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGを50:38:9:3

のモル比で含有し、N：P比は6.0であった。LNPを、Amicon PD-10フィルター（GE Healthcare）を使用して精製し、0.32mg/mlの濃度（LNP濃度）で使用した。CD-1雌マウス（1群当たりn=5）に、1mpkを静脈内投与した。投与後3時間で、動物を安楽死させ、肝臓を採取し、肝臓におけるCas9発現を測定した。Cas9タンパク質発現を、上に記載のMeso Scale Discovery ELISAアッセイを使用して、肝臓において測定した。およそ40～50mgの肝臓組織を、RIPA Buffer（Boston Bioproducts B-P-115）中のビーズミルによって、1×Complete Protease Inhibitor Tablet（Roche、カタログ11836170001）で均質化した。表13は、肝臓におけるCas9発現結果を示す。低Aおよび低A/Uコドンスキーム（配列番号311および312のORF）についてのmRNAは、試験したORFのうち最も高いCas9発現を示した。陰性対照のCas9タンパク質発現は、定量化の下限（LLOQ）未満であった。

【表13】

表13

| ORF     | 平均Cas9<br>(ng/g 肝臓) | 標準偏差 |
|---------|---------------------|------|
| TSS     | <LLOQ               | 0.0  |
| 配列番号204 | 1644                | 1172 |
| 配列番号252 | 1562                | 951  |
| 配列番号311 | 2630                | 730  |
| 配列番号312 | 2134                | 362  |

## 【0605】

インビボでのコドンスキームの有効性を決定するために、ゲノム編集を、異なるコドンスキームを使用して、Cas9をコードするmRNAからインビボで測定した。表27に示されるメッセンジャーRNAを、TTRを標的とするガイドRNA（G282、配列番号242）を有するLNPとして製剤化した。LNPは、クロスフロー手順を使用して組み立てられ、それぞれ、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGを50：38：9：3のモル比で含有し、N：P比は6.0であった。LNPを、Amicon PD-10フィルター（GE Healthcare）を使用して精製し、0.05mg/mlの濃度（LNP濃度）で使用した。CD-1雌マウス（1群当たりn=5、配列番号252で治療した群のn=4を除く）に、0.1mpkを静脈内投与した。投与後6日目に、動物を安楽死させ、血液および肝臓を採取し、血清TTRおよび肝臓編集を測定した。表14は、インビボ編集結果および血清TTRレベルを示す。

【表14】

表14

| ORF     | 編集%の平均 | 編集の標準偏差 | 血清TTR<br>(μg/ml) | 血清TTR<br>の標準偏差 | n |
|---------|--------|---------|------------------|----------------|---|
| TSS     | 0.06   | 0.05    | 856              | 68             | 5 |
| 配列番号204 | 40.96  | 8.41    | 329              | 143            | 5 |
| 配列番号252 | 60.10  | 8.07    | 143              | 78             | 4 |
| 配列番号311 | 57.26  | 4.15    | 216              | 62             | 5 |
| 配列番号312 | 61.44  | 4.50    | 100              | 79             | 5 |

## 【0606】

異なるmRNA濃度でのコドンスキームの有効性を決定するために、インビボ用量応答実験を行った。表15に示されるメッセンジャーRNAを、TTRを標的とするガイドRNA（G282、配列番号242）を有するLNPとして製剤化した。LNPは、クロスフロー手順を使用して組み立てられ、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGを含有していた。LNPを、Amicon PD-10フィルター（GE Healthcare）を使用して精製し、0.7mg/mlの濃度（LNP濃度）で使用した。CD-1雌マウス（1群当たりn=5）に、0.03、0.1、または0.3mpkを静脈内投与した。投与後7日目に、動物を安楽死させ、血液および肝臓を採取し、血清TTRおよび肝臓編集を測定した。表14は、インビボ編集結果および血清TTRレベルを示す。

【表15】

表15

| ORF     | 用量 (mpk) | 肝臓編集 (%) | 血清TTR (μg/ml) | 血清TTR (%KD) |
|---------|----------|----------|---------------|-------------|
| TSS     | n/a      | 0.1      | 576.8         | 0.0         |
| 配列番号204 | 0.3      | 51.3     | 165.6         | 71.3        |
|         | 0.1      | 17.3     | 540.7         | 6.3         |
|         | 0.03     | 1.9      | 761.4         | -32.0       |
| 配列番号252 | 0.3      | 57.0     | 100.8         | 82.5        |
|         | 0.1      | 29.6     | 336.1         | 41.7        |
|         | 0.03     | 5.0      | 636.4         | -10.3       |
| 配列番号311 | 0.3      | 59.4     | 93.8          | 83.7        |
|         | 0.1      | 30.6     | 373.5         | 35.2        |
|         | 0.03     | 5.9      | 559.6         | 3.0         |
| 配列番号312 | 0.3      | 60.6     | 92.0          | 87.2        |
|         | 0.1      | 25.5     | 397.5         | 31.1        |
|         | 0.03     | 7.8      | 555.3         | 3.7         |

【0607】

異なるUTRを有するコドンスキームの有効性を決定するために、Cas9をコードするmRNAの投与後にインビボでゲノム編集をインビボで測定した。表15に示されるメッセンジャーRNAを、TTRを標的とするガイドRNA（G282、配列番号242）を有するLNPとして製剤化した。LNPは、クロスフロー手順を使用して組み立てられ、それぞれ、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGを50:38:9:3のモル比で含有し、N:P比は6.0であった。LNPを、Amicon PD-10フィルター（GE Healthcare）を使用して精製し、0.05mg/mlの濃度（LNP濃度）で使用した。CD-1雌マウス（1群当たりn=5、配列番号243編集についてn=4）に、0.1mpkを静脈内投与した。投与後6日目に、動物を安楽死させ、血液および肝臓を採取し、血清TTRおよび肝臓編集を測定した。表16は、インビボ編集および血清TTRの結果を示す。

【表16】

表16

| mRNA構築物 | 編集% | 標準偏差 | 血清TTR (μg/ml) | 標準偏差 |
|---------|-----|------|---------------|------|
| TSS     | 0   | 0    | 1274          | 214  |
| 配列番号243 | 28  | 4    | 630           | 152  |
| 配列番号376 | 35  | 8    | 482           | 138  |
| 配列番号377 | 37  | 9    | 316           | 143  |
| 配列番号378 | 42  | 6    | 524           | 192  |

## 【0608】

実施例4－カニクイザルにおける30分間および2時間の静脈内注入を介して投与した複数回用量LNP研究

n = 3のコホートの雄のカニクイザルに、LNPまたはビヒクル対照投与の少なくとも1時間前に、2mg/kgの静脈内ボラス注射を介してデキサメタゾン（Dex）を投与した。各コホートは、NHP当たり3mg/kgまたは6mg/kg（RNA）を提供するために、様々な用量のLNPを摂取した。投薬群を表17に示す。2つのコホートは、注入時間を比較するために、3mg/kgのLNP用量を摂取した。製剤は、gRNA：mRNA比が重量基準で1：2で、配列番号377を含むCas9 mRNA）およびガイドRNA（gRNA）G000502（配列番号114）を含有していた。3mg/kgのLNP用量（全RNA含有量）を摂取したコホートに、30分間または120分間の静脈内注入によって投与した。様々な用量のLNP（単位mg/kg、全RNA含有量）を有する他のコホートはすべて、120分間の静脈内注入によって投与した。

## 【表17】

表17：注入試験投薬群

| 群番号 | 試験材料   | 用量レベル<br>(mg/kg) | 注入時間(分) | 動物の数 |
|-----|--------|------------------|---------|------|
| 1   | TSS    | 0                | 120     | 3    |
| 2   | カニクイザル | 3.0              | 120     | 3    |
| 3   | カニクイザル | 3.0              | 30      | 3    |
| 4   | カニクイザル | 6.0              | 120     | 3    |

## 【表18】

表18：編集%および血清TTR

| 群番号 | 肝臓編集(%)         | TTR%低減          |
|-----|-----------------|-----------------|
| 1   | 0.0 (0.0, 0.0,  | -28 (-34, -23,  |
| 2   | 63.3 (50.8, 69. | 85 (66, 95, 94) |
| 3   | 63.3 (65.0, 66. | 88 (90, 89, 86) |
| 4   | 74.5 (75.3, 74. | 96 (97, 96, 95) |

## 【0609】

投与後29日目に、ケタミン／キシラジンの筋肉内注射下で、16ゲージのSuper Core生検ニードルを使用して、肝臓の右葉／側面を標的とする単一の超音波ガイド下経皮生検により、肝臓検体を収集した。動物ごとに、1.0cm<sup>3</sup>～1.5cm<sup>3</sup>の全肝生検試料を収集した。各生検検体を液体窒素中でフラッシュ凍結させ、-80℃で保存した。前述のように、肝臓検体の編集分析をNGSシーケンシングによって行った。肝臓編集の結果、最大約70%の編集が実証された。記載され

【表 19】

表 19 : アラニン・トランスアミナーゼ (ALT) レベル

|                      | 出血前  |      | 6 時間 |      | 24 時間 |      | 48 時間 |      | 7 日目 |      | 29 日目 |      |
|----------------------|------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|                      | 平均   | 標準偏差 | 平均   | 標準偏差 | 平均    | 標準偏差 | 平均    | 標準偏差 | 平均   | 標準偏差 | 平均    | 標準偏差 |
| 群 1-TSS              | 49.0 | 11.1 | 17.3 | 3.6  | 17.5  | 2.9  | 15.6  | 2.1  | 76.0 | 4.5  | 49.0  | 8.8  |
| 群 2-3mpk、2 時間<br>注入  | 40.3 | 9.0  | 77.6 | 1.7  | 74.0  | 1.9  | 56.0  | 1.6  | 44.0 | 7.5  | 37.3  | 7.0  |
| 群 3-3mpk、30 分<br>間注入 | 50.3 | 7.5  | 14.9 | 0.0  | 28.3  | 3.5  | 23.3  | 2.9  | 88.3 | 8.8  | 35.6  | 6.3  |
| 群 4-6mpk、2 時間<br>注入  | 30.6 | 12.5 | 10.3 | 8.3  | 16.0  | 8.7  | 20.9  | 1.7  | 65.0 | 3.2  | 27.0  | 7.5  |

## 【0610】

肝臓試料を生検し、それぞれ、表 18 および図 3A～図 3B ならびに表 19 および図 3C にみられるように、編集パーセントデータ、血清 TTR データ、およびアラニン・トランスアミナーゼ (ALT) レベルについて分析した。肝臓編集および血清 TTR データの結果は、30 分間の注入時間による 3 mg / kg 用量と、120 分間の注入時間による 3 mg / kg 用量との間に有効性に有意差がないことを実証する。しかしながら、30 分間より長い注入時間の投与は、肝臓損傷バイオマーカーである ALT のレベル減少を示す。ALT レベルは、3 mg / kg 用量において、30 分間の注入時間の方が高いことが観察され、これは、潜在的な肝臓ストレスを示している。

## 【0611】

実施例 4 についての材料および方法。mRNA を、線状プラスミド DNA テンプレートおよび T7 RNA ポリメラーゼを使用したインビトロ転写 (IVT) によって合成した。転写は、一般に、T7 プロモーター (配列番号 231)、配列番号 377 (配列番号 311 の RNA ORF をコードする) などの本明細書に開示される転写配列、およびプラスミドにコードされるポリ A テール (配列番号 263) を含む構築物から行われた。



## 【0612】

すべての方法について、転写産物濃度を、260nm (Nanodrop) での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物を Bioanalyzer (Agilent) によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

## 【0613】

## LNP 製剤化

脂質成分を、以下に記載される脂質成分モル比で100%エタノールに溶解した。化学修飾したsgRNAおよびCas9 mRNAを組み合わせ、25mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、pH5.0に溶解し、およそ1.5mg/mLの全RNAカーゴ濃度を得た。LNPを、約6のN/P比で、以下に記載されるように、1:2 w/w比での化学修飾したsgRNA:Cas9 mRNAの比で、製剤化した。LNPを、50%の脂質A、9%のDSPC、38%のコレステロール、および3%のPEG2k-DMGで製剤化し、LNPを、実施例1に記載のクロスフロー技術によって形成した。混合中、差圧式流量を使用して、水性溶媒と有機溶媒の2:1の比を維持した。希釈したLNPを、タンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮し、次いで、濾過および貯蔵の前に、透析濾過により緩衝液を交換した。

10

## 【0614】

## Cas9 mRNAおよびgRNAカーゴ

キャップされたポリアデニル化Cas9 mRNAを、実施例1に記載の方法を使用して、線状プラスミドDNAテンプレートおよびT7 RNAポリメラーゼを使用したインビトロ転写によって生成した。

20

## 【0615】

## ゲノムDNA単離

ゲノムDNAを、肝臓試料から、50μL/ウェルのBuccalAmp DNA Extraction溶液 (Epicentre、カタログQE09050) を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。すべてのDNA試料に対し、本明細書に記載されるように、PCRおよびその後のNGS分析を行った。

## 【0616】

## NGSシーケンシング

簡単に述べると、ゲノム中の標的位置での編集効率を定量的に決定するために、ゲノムDNAが単離され、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を同定した。

30

## 【0617】

標的部位 (例えば、TTR) の周りのPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマー配列を以下に提供する。シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造業者 (Illumina) のプロトコルに従って追加のPCRを実施した。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有するものを除外した後に、リードをカニクイザル参照ゲノム (例えばmacFa5) とアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム (BAMファイル) にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、もしくは欠失を含むリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

40

## 【0618】

編集パーセンテージ (例えば、「編集効率」および「編集パーセント」) は、野生型を含む配列リードの総数に対する、挿入もしくは欠失を有する配列リードの総数として定義される。

以下に、本願の当初の特許請求の範囲に記載の発明を列挙する。

## [発明1]

組成物であって、

(i) RNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

50

a. 前記オープンリーディングフレームが、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 3 % の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の 5 0、2 0 0、2 5 0、もしくは 3 0 0 のヌクレオチドにわたって配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 3 % の同一性を有するか、または少なくともその最初の 3 0、5 0、7 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、もしくは 3 0 0 のヌクレオチドにわたって配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有し、かつ／あるいは

c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、もしくは 1 0 0 % が表 4 に列挙されるコドン、表 5 の低 A セット、または表 5 の低 A / U セットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 1 2 3 % の範囲であり、かつ／あるいは

e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 1 5 0 % の範囲である、核酸と、

( i i ) ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターであって、前記ガイド RNA が、配列番号 5 ～ 7 2、7 4 ～ 7 8、および 8 0 ～ 8 2 から選択されるガイド配列を含む、ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターと、を含む、組成物。

[ 発明 2 ]

T T R 遺伝子を修飾し、かつ／または前記 T T R 遺伝子内で二本鎖切断 ( D S B ) を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、前記組成物が、

( i ) RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. 前記オープンリーディングフレームが、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 3 % の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の 5 0、2 0 0、2 5 0、もしくは 3 0 0 のヌクレオチドにわたって配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 3 % の同一性を有するか、または少なくともその最初の 3 0、5 0、7 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、もしくは 3 0 0 のヌクレオチドにわたって配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有し、かつ／あるいは

c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、もしくは 1 0 0 % が表 4 に列挙されるコドン、表 5 の低 A セット、または表 5 の低 A / U セットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の 1 2 3 % の範囲であり、かつ／あるいは

e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の 1 5 0 % の範囲である、核酸と、

( i i ) ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターであって、前記ガイド RNA が、配列番号 5 ～ 7 2、7 4 ～ 7 8、および 8 0 ～ 8 2 から選択されるガイド配列を含む、ガイド RNA もしくはガイド RNA をコードするベクターと、を含む、方法。

[ 発明 3 ]

対象において T T R 血清濃度を低減し、T T R に関連するアミロイドーシス ( A T T R ) を治療し、かつ／または T T R を含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する方法であって、それを必要とする対象に組成物を投与することを含み、前記組成物が、

( i ) RNA ガイド DNA 結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸であって、

a. 前記オープンリーディングフレームが、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含み、かつ／あるいは

10

20

30

40

50

b. 前記オープンリーディングフレームが、少なくともその最初の30、50、70、100、150、200、250、もしくは300のヌクレオチドにわたって配列番号311と少なくとも95%の同一性を有し、かつ／あるいは

c. 前記オープンリーディングフレームが、コドンの少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%が表4に列挙されるコドン、表5の低Aセット、または表5の低A/Uセットであるコドンのセットからなり、かつ／あるいは

d. 前記オープンリーディングフレームは、アデニン含有量が、その最小アデニン含有量～その最小アデニン含有量の150%の範囲であり、かつ／あるいは

e. 前記オープンリーディングフレームは、アデニンジヌクレオチド含有量が、その最小アデニンジヌクレオチド含有量～その最小アデニンジヌクレオチド含有量の150%の範囲である、核酸と、

(ii) ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターであって、前記ガイドRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82から選択されるガイド配列を含む、ガイドRNAもしくはガイドRNAをコードするベクターと、を含み、それによって、前記対象においてTTR血清濃度を低減し、TTRに関連するアミロイドーシス(AATTR)を治療し、かつ／またはTTRを含むアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する、方法。

〔発明4〕

前記ガイドRNAが、配列番号5、6、7、8、9、12、13、14、15、16、17、22、23、27、29、30、35、36、37、38、55、61、63、65、66、68、または69から選択されるガイド配列を含む、発明1～3のいずれか一つに記載の組成物または方法。

〔発明5〕

細胞もしくは対象において前記TTR遺伝子内の二本鎖切断(DSB)を誘導し、細胞もしくは対象において前記TTR遺伝子を修飾し、対象においてTTRに関連するアミロイドーシス(AATTR)を治療し、対象においてTTR血清濃度を低減し、または対象においてアミロイドもしくはアミロイド原線維の蓄積を低減もしくは予防する際に使用するための、発明1または4に記載の組成物。

〔発明6〕

前記方法が、30分間より長く、例えば、約45～75分間、75～105分間、105～135分間、135～165分間、165～195分間、195～225分間、225～255分間、255～285分間、285～315分間、315～345分間、345～375分間、約1.5～6時間、約60分間、約90分間、約120分間、約150分間、約180分間、または約240分間の注入によって前記組成物を投与することを含む、発明2～5のいずれか一つに記載の使用のための組成物または方法。

〔発明7〕

前記組成物が、前記組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、例えば少なくとも50%、血清TTRレベルを低減するか、または前記組成物の投与前の血清TTRレベルと比較して、50～60%、60～70%、70～80%、80～90%、90～95%、95～98%、98～99%、もしくは99～100%、血清TTRレベルを低減する、発明2～6のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明8〕

前記組成物が、前記TTR遺伝子の編集を引き起こし、任意選択で、前記編集が、編集される集合体のパーセンテージ(編集パーセント)として計算され、さらに任意選択で、前記編集パーセントが、前記集合体の30～99%、例えば、前記集合体の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%である、発明2～7のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明9〕

前記組成物が、少なくとも1つの組織におけるアミロイド沈着を低減し、任意選択で、前記少なくとも1つの組織が、胃、結腸、坐骨神経、または後根神経節のうちの1つ以上を含む、発明2～8のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明10〕

アミロイド沈着が、前記組成物の投与の8週間後に測定される、発明9に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明11〕

アミロイド沈着が、前記組成物の投与前にみられるアミロイド沈着の30～35%、35～40%、40～45%、45～50%、50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%、75～80%、80～85%、85～90%、90～95%、または95～99%低減する、発明9または10に記載の方法または使用のための組成物。

10

〔発明12〕

前記組成物が、少なくとも2回投与または送達される、発明2～11のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明13〕

前記投与または送達が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15日間の間隔で、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15週間の間隔で、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15ヶ月間の間隔で行われる、発明12に記載の方法または使用のための組成物。

20

〔発明14〕

前記ガイドRNAが、前記ガイド配列を含み、かつ配列番号126のヌクレオチド配列をさらに含むcrRNAを含み、前記配列番号126のヌクレオチドが、前記ガイド配列にその3'末端で続く、発明1～13のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明15〕

前記ガイドRNAが、シングルガイド(sgRNA)である、発明1～14のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明16〕

前記sgRNAが、配列番号3のパターンを有するガイド配列を含む、発明15に記載の方法または組成物。

30

〔発明17〕

前記sgRNAが、配列番号3の配列を含む、発明15または16に記載の方法または組成物。

〔発明18〕

前記sgRNAが、配列番号5～72、74～78、および80～82の前記ガイド配列、ならびに配列番号126の前記ヌクレオチドのうちのいずれか1つを含む、発明15～17のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明19〕

前記sgRNAが、配列番号87～113、115～120、および122～124から選択される配列と少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、または90%同一である配列を含む、発明15～17のいずれか一つに記載の方法または組成物。

40

〔発明20〕

前記sgRNAが、配列番号87～113、115～120、および122～124から選択される配列を含む、発明19に記載の方法または組成物。

〔発明21〕

前記ガイドRNAが、少なくとも1つの修飾を含む、発明1～20のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明22〕

50

前記少なくとも1つの修飾が、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチド、ヌクレオチド間ホスホロチオエート(PS)結合、または2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む、発明21に記載の方法または組成物。

[発明23]

前記少なくとも1つの修飾が、5'末端における最初の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上および／または3'末端における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つ以上における修飾を含む、発明21または22に記載の方法または組成物。

[発明24]

前記少なくとも1つの修飾が、最初の4個のヌクレオチド間および／または最後の4個のヌクレオチド間のPS結合を含む、発明21～23のいずれか一つに記載の方法または組成物。

[発明25]

前記少なくとも1つの修飾が、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドおよび／または3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む、発明21～24のいずれか一つに記載の方法または組成物。

[発明26]

前記ガイドRNAが、配列番号3の修飾ヌクレオチドを含む、発明21～25のいずれか一つに記載の方法または組成物。

[発明27]

前記ガイドRNAおよびRNAガイドDNA結合剤をコードするオープンリーディングフレームを含む前記核酸が、脂質ナノ粒子(LNP)と会合している、発明1～26のいずれか一つに記載の方法または組成物。

[発明28]

前記LNPが、CCD脂質を含み、任意選択で、前記CCD脂質が、脂質Aまたは脂質Bであり、さらに任意選択で、前記CCD脂質が、脂質Aである、発明27に記載の方法または組成物。

[発明29]

前記LNPが、ヘルパー脂質を含み、任意選択で、前記ヘルパー脂質が、コレステロールである、発明27または28に記載の方法または組成物。

[発明30]

前記LNPが、ステルス脂質(例えば、PEG脂質)を含み、任意選択で、前記ステルス脂質が、PEG2k-DMGである、発明27～29のいずれか一つに記載の方法または組成物。

[発明31]

(i) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN/P比が、約6であり、

(ii) 前記LNPが、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約2.7～39.5mol%のヘルパー脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、前記LNP組成物のN/P比が、約5～7(例えば、約6)であり、

(iii) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN/P比が約3～10であり、

(iv) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質(例えば、PEG脂質)とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり

10

20

30

40

50

、前記LNP組成物のN／P比が、約6であり、

(v) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約5～15mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が、約6であり、

(v i) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約0～10mol%の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が、約3～10であり、

(v i i) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1mol%未満の中性脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が約3～10であり、

(v i i i) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約40～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約1.5～10mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が約3～10であり、前記LNP組成物が、中性リン脂質を本質的に含まないか、または含まず、あるいは

(i x) 前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50～60mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約8～10mol%の中性脂質と、約2.5～4mol%のステルス脂質（例えば、PEG脂質）とを含み、前記脂質成分の残りが、ヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が約3～7である、発明27～30のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明32〕

前記LNPが、約6のN／P比を有する、発明26～31のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明33〕

前記LNPが、中性脂質を含み、任意選択で、前記中性脂質が、DSPCである、発明26～32に記載の方法または組成物。

〔発明34〕

前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50mol%の脂質Aなどのアミン脂質と、約9mol%のDSPCなどの中性脂質と、約3mol%のPEG脂質などのステルス脂質（例えば、PEG2k-DMG）とを含み、前記脂質成分の残りが、コレステロールなどのヘルパー脂質であり、前記LNP組成物のN／P比が、約6である、発明32のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明35〕

前記LNPが、脂質成分を含み、前記脂質成分が、約50mol%の脂質Aと、約9mol%のDSPCと、約3mol%のPEG2k-DMGとを含み、前記脂質成分の残りが、コレステロールであり、前記LNP組成物のN／P比が、約6である、発明32のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明36〕

前記RNAガイドDNA結合剤が、Casクリパーゼである、発明1～35のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明37〕

前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9である、発明36に記載の方法または組成物。

〔発明38〕

前記RNAガイドDNA結合剤が修飾されており、任意選択で、修飾された前記RNAガイドDNA結合剤が、核局在化シグナル（NLS）を含む、発明1～37のいずれか一つに記載の方法または組成物。

10

20

30

40

50

〔発明 39〕

前記RNAガイドDNA結合剤が、II型CRISPR/Cas系由来のCasである、発明1～38のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 40〕

前記組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容される担体をさらに含む、発明1～39のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 41〕

非相同性末端結合（NHEJ）が、前記TTR遺伝子においてフレームシフトまたはナンセンス変異を誘導する前記TTR遺伝子におけるDSBの修復中に変異を引き起こす、発明40に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 42〕

フレームシフトまたはナンセンス変異が、肝臓細胞の少なくとも50%の前記TTR遺伝子において誘導される、発明41に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 43〕

ヌクレオチドの欠失または挿入が、前記TTR遺伝子において、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも50倍以上生じる、発明41または42に記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 44〕

前記ガイドRNAの配列が、

a) 配列番号92もしくは104、

b) 配列番号87、89、96、もしくは113、

c) 配列番号100、102、106、111、もしくは112、または

d) 配列番号88、90、91、93、94、95、97、101、103、108、もしくは109であり、

任意選択で、前記ガイドRNAが、初代ヒト肝細胞のゲノム内のタンパク質コード領域内で発生するオフターゲット部位でインデルを生成しない、発明1～43のいずれか一つに記載の方法または組成物。

〔発明 45〕

前記組成物を投与することで、前記対象におけるTTRのレベルを低減する、発明2～44のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 46〕

前記対象が、ATTRwtまたは遺伝性ATTRなどのATTRを有する、発明2～45のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 47〕

前記対象が、ヒトである、発明2～46のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 48〕

前記対象が、家族性アミロイドポリニューロパチー、ATTRの神経症状のみ、または主にATTRの神経症状、家族性アミロイド心筋症、またはATTRの心臓症状のみ、または主にATTRの心臓症状を有する、発明2～47のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 49〕

前記対象が、V30A、V30G、V30L、もしくはV30MなどのV30変異を有するTTRを発現し、前記対象が、T60AなどのT60変異を有するTTRを発現し、前記対象が、V122A、V122I、もしくはV122（－）などのV122変異を有するTTRを発現し、または前記対象が、野生型TTRを発現する、発明2～48のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 50〕

前記対象が、投与後に、感覚運動ニューロパチーの症状が改善し、安定化し、もしくは変化が遅くなり、かつ／または前記対象が、うっ血性心不全の症状が改善し、安定化し、

10

20

30

40

50

もしくは変化が遅くなる、発明 2 ～ 4 9 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 5 1〕

前記組成物または薬学的製剤が、ウイルスペクターを介して投与される、発明 2 ～ 5 0 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 5 2〕

前記組成物または薬学的製剤が、脂質ナノ粒子を介して投与される、発明 2 ～ 5 0 のいずれか一つに記載の方法または使用のための組成物。

〔発明 5 3〕

配列番号 5 ～ 7 2、7 4 ～ 7 8、および 8 0 ～ 8 2 から選択される配列が、配列番号 5、6、9、13、14、15、16、17、22、23、27、30、35、36、37、38、55、63、65、66、68、または 6 9 である、先行発明のいずれか一つに記載の方法または組成物。

10

〔発明 5 4〕

前記オープンリーディングフレームが、配列番号 3 1 1 と少なくとも 9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、発明 1 ～ 5 3 のいずれか一つに記載の組成物または方法。

〔発明 5 5〕

前記オープンリーディングフレームの前記コドンの少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 1 0 0 % が、表 4、表 5、または表 7 に列挙されるコドンである、発明 1 ～ 5 4 のいずれか一つに記載の組成物または方法。

20

〔発明 5 6〕

前記オープンリーディングフレームが、配列番号 3 7 7 と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 1 0 0 % の同一性を有する配列を含む、発明 1 ～ 5 5 のいずれか一つに記載の組成物または方法。

〔発明 5 7〕

前記核酸が、前記ウリジンの少なくとも 1 0 % が修飾ウリジンで置換される m R N A である、発明 1 ～ 5 6 のいずれか一つに記載の組成物または方法。

〔発明 5 8〕

前記修飾ウリジンが、N 1 -メチル-シュードウリジン、シュードウリジン、5 -メトキシウリジン、または 5 -ヨードウリジンのうちの 1 つ以上である、発明 5 7 に記載の組成物または方法。

30

〔発明 5 9〕

A T T R を有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、発明 1 または 4 ～ 5 8 のいずれか一つに記載の組成物または製剤の使用。

【0 6 1 9】

配列表

以下の配列表は、本明細書に開示される配列のリストを提供する。D N A 配列（T を含む）が、R N A に関して参照される場合、T は、U で置き換えられるべきであり（文脈に応じて、修飾または非修飾であり得る）、逆もまた同様であることが理解される。

40



【表 2 0 - 1】

| 配列番号 |  | 説明 |
|------|--|----|
|------|--|----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2】

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSDの5' U<br>TR、配列番号<br>204に対応す<br>るORF、Ko<br>zak配列、お<br>よびALBの<br>3' UTRを有<br>するCas9転<br>写産物 | GGGTCCCCGCAAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGGTGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACA<br>GCATCGGACTGGACATCGGAACAACACAGGTCGGATGGGCAGTCAT<br>CACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGA<br>AACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACCTGC<br>TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC<br>AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAACTCTGCTACCTG<br>CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGCTCGAAGAACAGACAAGAACGA<br>CGAAGAACAACCGATCTTCGGAACAATCGTCTCGAAGAGTCCGATAC<br>CACGAAAAGTACCCGACAACTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCG<br>ACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC<br>ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTG<br>AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCC<br>AGACATACAACCAGCTGTTCTGAAAGAAACCCTGATCAACGCAAGCGG<br>AGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAAACAACCTGATCGCAACAGCTGCCGGAGAAAGAAGAACG<br>GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA<br>TCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAG<br>CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATC<br>ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAAC |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACCAGGACCCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>TACGCAGGATACATCGACGGAGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCCTACA<br>AGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGACGGAAACAGAAAGAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACA<br>TTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACCTTCTACCCGTTCTGAAAGGA<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTAC<br>TACGTCGGACCGCTGGCAAGAGAGAAACAGCAGATTCGCATGGATGA<br>CAAGAAGAGCGAAGAAACAATCAACCCGTGGAACTTCGAAGAAGT<br>CGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACA<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAGGTCTCTGCCGAAGCACA<br>GCCGTGTGTACGAAATACTTCACAGTCTACAAAGAACTGACAAAGGT<br>CAAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGA<br>GAACAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAAGCAAAACAGAA<br>AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGA<br>ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAAGGGAGTCGAAGACAGATTCAAC<br>GCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAACCGAAGACATCCTGGAAAGACAT<br>CGTCCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA<br>AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCTATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGAAAGACTGAGCAGAA<br>GCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAC TTCTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCCAAAACAGAAACTTTCATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGC<br>ACAGGTCAGGGACAGGGAGACAGCCTGCCAGAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACACAGAAAG<br>GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAGGAA<br>TCAAGGAAC TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAA<br>CACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCCAGAAC<br>GGAAAGAGCATGTACGTGGACCGAAGAACTGGACATCAACAGACTGA<br>GGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGTGAAGGA<br>CGACAGCATCGACAAACAAAGTCTCTGACAAAGAAAGCGAACAGACAG<br>GGAAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGGAAGATCGTCAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAACGCAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACTTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGGAA<br>CTGGACAAAGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGAC<br>AGATCACAAAGCACGTCCGACACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAAACAC<br>AAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGTCAAGAGAAATCAACAACTACCAACACGCAACGACGCGC<br>ATACCTGAACGCGAGTCGTCCGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGGAATTCTGTCTACGGGAGACTACAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGA<br>CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGAGGTCAACATC<br>GTCAAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAGCA<br>TCCTGCGGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGA<br>CTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAATCACAAATCATGGAAAG<br>AAGCAGCTTCGAAAGAACCCGATCGACTTCTTGGAAAGCAAGGGA<br>TACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA<br>GCCGTGTCGAACTGGAAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGGAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCCGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGA<br>GCCGGAAAGCAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCGTGAAACAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACACAGATCAGCGAATTCAGCAAG<br>AGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTTGGACAAAGTCTGTAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA<br>AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAGCCCCGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

10

20

30

40

50

【表 20 - 6】

|                                                             |                                                                                                                                                                                                 |   |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
|                                                             | AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGAT<br>CAATAGCTTATTCACTCTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAGCCAA<br>CACCTGTCTAAAAACAATAAATTTCTTTAATCATTTTGCTCTTT<br>TCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG |   |
| G000739<br>-sgRNA陰<br>性対照                                   | mG*mAmU*CAcGUcGcCGUUGcGcGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAm<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mU                                   | 2 |
| 修飾sgRNA<br>配列（「N」は<br>任意の天然または<br>非天然ヌクレ<br>オチドであって<br>もよい） | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAm<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mU                              | 3 |
| 30/30/3<br>9ポリA配列                                           | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAA<br>CUGCUCCUCCUCCUUGC                                                            | 4 |
| ヒトTTR（エ<br>クソン1）を標<br>的とするCR0<br>03335 g<br>RNA             |                                                                                                                                                                                                 | 5 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7】

|                                                   |                      |   |
|---------------------------------------------------|----------------------|---|
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03336 g<br>RNA | CCUCCUUGGCUUUGCUGGAC | 6 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03337 g<br>RNA | CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG | 7 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03338 g<br>RNA | AUACCAGUCCAGCAAGGCAG | 8 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03339 g<br>RNA | ACACAAAUACCAGUCCAGCA | 9 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03340 g<br>RNA | UGGACUGGUAUUUGUGUCUG | 10 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>03341 g<br>RNA | CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC | 11 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03342 g<br>RNA | CUUCUCUACACCCAGGGCAC | 12 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03343 g<br>RNA | CAGAGGACACUUGGAUUCAC | 13 |

10

20

30

40

50



【表 20-9】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03344 g<br>RNA | UUUGACCAUCAGAGGACACU | 14 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03345 g<br>RNA | UCUAGAACUUUGACCAUCAG | 15 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03346 g<br>RNA | AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG | 16 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03347 g<br>RNA | CAUUGAUGGCAGGACUGCCU | 17 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 10】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03348 g<br>RNA | AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG  | 18 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03349 g<br>RNA | UGCACGGGCCACAUUGAUGGC | 19 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03350 g<br>RNA | CACAUGCACGGGCCACAUGA  | 20 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03351 g<br>RNA | AGCCUUUCUGAACACAUGCA  | 21 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03352 g<br>RNA | GAAAGGCGUGUGAUGACACC | 22 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03353 g<br>RNA | AAAGGCGUGUGAUGACACCU | 23 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03354 g<br>RNA | ACCUGGAGCCAUUUGCCUC  | 24 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03355 g<br>RNA | CCAGAGGCCAAUGGCUC    | 25 |

10

20

30

40

50

【表 20-12】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03356 g<br>RNA | GCAACUUACCCAGAGGCAAA | 26 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>03357 g<br>RNA | UUCUUUGGCAACUUACCCAG | 27 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03358 g<br>RNA | AUGCAGCUCUCCAGACUCAC | 28 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03359 g<br>RNA | AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA | 29 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03360 g<br>RNA | GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU  | 30 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03361 g<br>RNA | GCUGCAUGGGCCUCACAACUG | 31 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03362 g<br>RNA | GCAUGGGCCUCACAACUGAGG | 32 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03363 g<br>RNA | ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA  | 33 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03364 g<br>RNA | CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA  | 34 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03365 g<br>RNA | UGUAGAAGGGAUAUACAAAG  | 35 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03366 g<br>RNA | AAAUAGACACCAAAUCUUAAC | 36 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03367 g<br>RNA | AGACACCAAAUCUUAUCUGGA | 37 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03368 g<br>RNA | AAGUGCCUUC CAGUAAGAUU | 38 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03369 g<br>RNA | CUCUGCAUGCU CAUGGAAUG | 39 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03370 g<br>RNA | CCUCUGCAUGCU CAUGGAAU | 40 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03371 g<br>RNA | ACCUCUGCAUGCU CAUGGAA | 41 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6】

|                                                   |                       |     |
|---------------------------------------------------|-----------------------|-----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>03372 g<br>RNA | UACUCACCUUGCAUGCUCA   | 4 2 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03373 g<br>RNA | GUAUUCACAGCCAAACGACUC | 4 3 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03374 g<br>RNA | GCGCGGGGGCCGGAGUCGU   | 4 4 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03375 g<br>RNA | AAUGGUGUAGCGGGGGGGC   | 4 5 |

10

20

30

40

50



【表 20-17】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03376 g<br>RNA | CGGCA AUGGUGUAGCGGGG | 46 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03377 g<br>RNA | GCGGCAAUGGUGUAGCGGG  | 47 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03378 g<br>RNA | GCGGGCAAUGGUGUAGCGGC | 48 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03379 g<br>RNA | GCGGGCAAUGGUGUAGCGGG | 49 |

10

20

30

40

50

【表 20-18】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03380 g<br>RNA | GCAGGGGGCA AUGGUGUAG  | 50 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03381 g<br>RNA | GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA  | 51 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03382 g<br>RNA | GGAGUAGGGGCCUCAGCAGGG | 52 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03383 g<br>RNA | AUAGGAGUAGGGGCCUCAGCA | 53 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03384 g<br>RNA | AAUAGGAGUAGGGGCUACAGC | 54 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03385 g<br>RNA | CCCCUACUCCUAUUCACCA   | 55 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03386 g<br>RNA | CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG  | 56 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03387 g<br>RNA | GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA  | 57 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 20】

|                                                   |                      |    |
|---------------------------------------------------|----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03388 g<br>RNA | GACGACAGCCGUGGUGGAAU | 58 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03389 g<br>RNA | AUUGGUGACGACAGCCGUGG | 59 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03390 g<br>RNA | GGGAUUGGUGACGACAGCCG | 60 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>03391 g<br>RNA | GGCUGUCGUCACCAAUCCCA | 61 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1】

|                                     |                       |     |
|-------------------------------------|-----------------------|-----|
| ヒトTTR (エクソン4) を標的とするCR0 03392 g RNA | AGUCCCUCAUUCUUUGGGAU  | 6 2 |
| ヒトTTR (エクソン1) を標的とするCR0 05298 g RNA | UCCACUCAUUCUUUGGCAGGA | 6 3 |
| ヒトTTR (エクソン4) を標的とするCR0 05299 g RNA | AGCCGGUGGUGGAUAGGAGU  | 6 4 |
| ヒトTTR (エクソン1) を標的とするCR0 05300 g RNA | UCACAGAAACACUCACCGUA  | 6 5 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2】

|                                                   |                       |    |
|---------------------------------------------------|-----------------------|----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン1) を標<br>的とするCR0<br>05301 g<br>RNA | GUACAGAAACACUCACCGU   | 66 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>05302 g<br>RNA | ACGUGUCUUCUCUACACCCA  | 67 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>05303 g<br>RNA | UGAAUCCAAAGUGUCCUCUGA | 68 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン2) を標<br>的とするCR0<br>05304 g<br>RNA | GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA  | 69 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3】

|                                                   |                       |     |
|---------------------------------------------------|-----------------------|-----|
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>05305 g<br>RNA | UAUAGGAAACACAGUGAGUC  | 7 0 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン3) を標<br>的とするCR0<br>05306 g<br>RNA | AAAUCUUACUGGAAGGCACU  | 7 1 |
| ヒトTTR (エ<br>クソン4) を標<br>的とするCR0<br>05307 g<br>RNA | UGUCUGUCUUCUCAUAGG    | 7 2 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るCR0006<br>89 gRNA          | ACACAAAUACCAAGUCCAGCG | 7 3 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るCR0053<br>64 gRNA          | AAAGGCGUGAUGAGACCU    | 7 4 |

10

20

30

40

50

【表 20-24】

|                                          |                      |    |
|------------------------------------------|----------------------|----|
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>65 gRNA | CAUUGACAGCAGGACUGCCU | 75 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>66 gRNA | AUACCAGUCCAGCGAGGCAG | 76 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>67 gRNA | CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG | 77 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>68 gRNA | CCUCCUCUGCCUCCUGGAC  | 78 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>69 gRNA | AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG | 79 |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 2 5】

|                                          |                                                                                                                                                         |    |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>70 gRNA | ACUUGUCUUCUUAUACCCA                                                                                                                                     | 80 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>71 gRNA | AAGUGACUUCAGUAAGAUAU                                                                                                                                    | 81 |
| カニクイザルト<br>TRを標的とする<br>CR0053<br>72 gRNA | AAAAGGCGUGAUGAGACC                                                                                                                                      | 82 |
|                                          | 未使用                                                                                                                                                     | 83 |
|                                          | 未使用                                                                                                                                                     | 84 |
|                                          | 未使用                                                                                                                                                     | 85 |
|                                          | 未使用                                                                                                                                                     | 86 |
| ヒトTTRを標<br>的とするGOO<br>0480 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mA*mA*GGCUGCUGACACCCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAGUUAAAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 87 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 26】

|                                          |                                                                                                                                                                 |    |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0481 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mC*mU*AGAAUUUGACCAUUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 88 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0482 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mG*mU*AGAGGGAUUAUCAAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 89 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0483 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mC*mC*ACUCAUUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 90 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0484 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mG*mA*CACCAAUCUUACUUGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 91 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0485 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mC*mU*CCUCUUGCCUUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU    | 92 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 27】

|                                          |                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0486 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mC*mA*C*AAAUACCAAGUCCAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 93 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0487 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 94 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0488 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 95 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0489 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 96 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0490 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mA*mA*UAGACACCAAAUCUUAACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 97 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 28】

|                                          |                                                                                                                                                                       |     |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0491 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCCAGGCUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU      | 98  |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0492 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mU*mU*mU*CUUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 99  |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0493 sg<br>RNA修飾配列 | mA*mA*mG*UGCCUUCACGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 100 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0494 sg<br>RNA修飾配列 | mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 101 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0495 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 102 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 29】

|                                          |                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0496 sg<br>RNA修飾配列 | mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAAGUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU       | 103 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0497 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mU*mG*CUCCUCUUGCCUUUGCUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU       | 104 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0498 sg<br>RNA修飾配列 | mAmG*mU*mG*U*GAGUCUGGAGAGCUCUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 105 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0499 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU     | 106 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0500 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAAGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU     | 107 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 30】

|                                          |                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0501 sg<br>RNA修飾配列 | mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU     | 108 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0567 sg<br>RNA修飾配列 | mG*mA*mA*AGGCGUGAUGACACCGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 109 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0568 sg<br>RNA修飾配列 | mG*mG*mC*UGUCGUACCAAUCCCAGUUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 110 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0570 sg<br>RNA修飾配列 | mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 111 |
| ヒトTTRを標<br>的とするG00<br>0571 sg<br>RNA修飾配列 | mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 112 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 31】

|                                                      |                                                                                                                                                                       |     |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ヒト TTR を標<br>的とする G00<br>0572 sg<br>RNA 修飾配列         | mC*mC*mC*mC*CUACUCCUUAUCCACCAGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 113 |
| カニクイザル T<br>TR を標的とす<br>る G00050<br>2 sg RNA<br>修飾配列 | mAmC*mAmAmC*AAAUACCAAGUCCAGCGGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 114 |
| カニクイザル T<br>TR を標的とす<br>る G00050<br>3 sg RNA<br>修飾配列 | mAmC*mAmAmC*AGGCUCCUGAUGAGACCGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 115 |
| カニクイザル T<br>TR を標的とす<br>る G00050<br>4 sg RNA<br>修飾配列 | mAmC*mAmAmC*AGGCUCCUGAUGAGACCGUUUUAAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 116 |

10

20

30

40

50

【表 20-32】

|                                                    |                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るG00050<br>5 s g RNA<br>修飾配列 | mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU   | 117 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るG00050<br>6 s g RNA<br>修飾配列 | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 118 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るG00050<br>7 s g RNA<br>修飾配列 | mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU    | 119 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とす<br>るG00050<br>8 s g RNA<br>修飾配列 | mC*mC*mU*CCUCUGCCUGCGUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU  | 120 |

10

20

30

40

50



【表 20-33】

|                                                    |                                                                                                                                                                       |       |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| カニクイザルT<br>TRを標的とする<br>G00050<br>9 s g RNA<br>修飾配列 | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mUmU        | 1 2 1 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とする<br>G00051<br>0 s g RNA<br>修飾配列 | mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mUmU    | 1 2 2 |
| カニクイザルT<br>TRを標的とする<br>G00051<br>1 s g RNA<br>修飾配列 | mA*mA*mG*UGACUUCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mUmU     | 1 2 3 |
| マウスTTRを<br>標的とするG0<br>00282 s<br>g RNA修飾配<br>列     | mU*mUmU*mA*CAGCCACGUUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mUmU*mUmU | 1 2 4 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 4】

|                                          |                                                                                       |               |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| s g RNAを形成するためのガイド配列の3'末端に続く例示的なヌクレオチド配列 | GUUUUAGAGGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCGUUAU<br>CAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU | 1 2 5         |
| c r RNAを形成するためのガイド配列の3'末端に続く例示的なヌクレオチド配列 | GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG                                                               | 1 2 6         |
|                                          | 未使用                                                                                   | 1 2 7 ~ 2 0 2 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 5】

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C a s 9 ア ミ ノ<br>酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVSDTKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDL<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAIILSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHISLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIILDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLI REVKVI TLKSKLVSDF<br>RKDFQFYKVREINNYYHHAIDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 203 |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 6】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHY<br>EKLKGSPEQNEQQLFVEQHIIYLD EII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGSPKKRKV |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 7】

|                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C a s 9 mR<br>NAオーバープレ<br>ーディングフレ<br>ーム (ORF)<br>2 | AUGGACAAGAAAGUACAGCAUUCGGACUUGGACAUUCGGAACAACAAGCG<br>UCGGAUUGGCGAGUCAUCACAGACGAUAUACAAGGUCCCGAGCAAGAA<br>GUUCAAGGUCCUGGGAACAACAGACAGACAGACAGCAUCAGAAGAAGAC<br>CUGAUCGGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAA<br>CAAGACUGAAGAGAAACAGCAAGAAAGAAUACACAGAAAGAAAGAA<br>CAGAAUCUGCUACCUAGCAGGAAAUUCUACAGCAACGAAAUUGGCAAG<br>GUCGACGACAGCUUCUUCACAGACUGGAAGAAAGCUUCUGGUCG<br>AAGAAACAAAGAACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGU<br>CGACGAAGUCGCAUACCAAGAAAGUAACCCGACAAUCUACCAACUUG<br>AGAAAGAAAGCUGGUCGACAGCAAGCAAGCAAGGCAAGCCUGAGACUGA<br>UCUACCUUGGCACUGGCACACAUAGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCU<br>GAUCGAAAGGAGACCUGAACCCGGACAAACAGCGACGUCGACAAAGCUG<br>UUCAUCCAGCUGGUCAGACAUACAACCAAGCUUUCGAAAGAAACC<br>CGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAGGCAAUCCUGAGCGCAAG<br>ACUGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAAACCCUGAUCGCAACGCGCG<br>GGAGAAAGAAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCAUGAGCC<br>UGGACUGACACCGAACUUCAGAGCAACUUCGACCUUGGCAAGAA<br>CGCAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACCUUGGAC<br>AACCUUGCGGCACAGAUCCGGAGACCAAGUACGCAAGCCUGUCCUGG<br>CAGCAAGAAACCUAGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAG<br>AGUCAACACAGAAAUCAAAAGGCAACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUC<br>AAGAGAUACGACGAAACACCAACGAGGACCUGACACUGCUGAAGGCAC<br>UGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAGUAACAAGGAAAUUCUUCGCA | 204 |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 8】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGC<br>CAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAGAUUG<br>ACGGAACAGAAAGACUCUGGUCAGCUGAACAGAGAAAGACCUUGCU<br>GAGAAAGCAGAGAACAUUCGACACAGGAAGCAUCCCGCACAGAU<br>CACCUGGGAGAACUGCACGCCAUCCUGAGAGACAGAGAACUUCU<br>ACCCGUUCCUGAAGGACACAGAGAAAAGAUCCGAAAAGAUCCUGAC<br>AUUCAGAAUCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGGAAGAAACAACACACCGU<br>GGAACUUCGAAAGAGUCGUCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCUU<br>CAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAAGAACCUCCGAAACGAAAG<br>GUCCUGCCGAAAGCACAGCCUGUCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACA<br>ACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGACAGAAAGGAUUGAGAAAGCC<br>GGCAUUCUUGAGCGGAGAACAGAGAAAGGCAAUCCUGGACCUUG<br>UUCAAAGACAAACAGAAAGUACAGUCACAGUCAGCAGCUGAAGGAAGACU<br>ACUUCAGAAGAUUCGAUUGCUUCGACAGCGUCGAAAUACAGCGGAGU<br>CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUAACACGACCUUGCUG<br>AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUGGACAAACGAGAAACGAAAG<br>ACAUCUUGGAAAGACAUCCGUCUCCUGACACUAGACACUGUUCGAAAGACAG<br>AGAAAUUGAUCCGAAAGAAAGACUGAAGACAUACGCGCACACCUUGUCCGAC<br>GACAAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAAAGAAUACACAGGAUUGGG<br>GAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAAGCAGAG<br>CGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUUGAAGAGCGACGGAAUUCGCAAC<br>AGAAACUUCAUUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCACAGG |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 3 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUACAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCA<br>CGAACACAUCGCAAAACCUGGCAGGAAGCCCGCAAUCAAGAGGA<br>AUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAAACUGGUCAAGGUCAUGG<br>GAAGACACAAGCCGGAACAAACAUCGUCAUCGAAAUUGCAAGAGAAA<br>CCAGACAACACAGAGGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAAGAAAGGAUUCAGGAACUUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGG<br>AACACCCGGUCCGAACACACACAGCUGCAGAACGAAAGCUGUACCU<br>GUACUACUUGCAGAACGGAAGAGACAUUAAGUACGUACCCAGGAACUG<br>GACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUGGACCAUCCGUCGCCGC<br>AGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAAACAGGUCCUGACAAAG<br>AAGCGACAAGAAACAGAGGAAAGAGCGACAAACGUCCCGAGCGAAGAA<br>GUCGUCAAGAAAGAUAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCCAA<br>AGCUGAUCCACACAGAGAAAGUUCGACAAACUAGCAAGGCAGAGAG<br>AGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAG<br>CUGGUCCGAACACAGACAGAUCCACAAAGCACGUCGACACAGAUCCUGG<br>ACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAACGACAGCUGAUUCAG<br>AGAAAGUCAAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAAGCGACUUC<br>AGAAAGGACUUCAGUUCUACAAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACC<br>ACCACGCACAGACGCAUACCUAGACCGAGUCCGUAACAGCACU<br>GAUCAAGAAAGUACCCGAAAGCUAGAAAGCGAAAUUCGUUACCGGAGAC<br>UACAAGGUCAAGCAGCUGCAGAAAGAUUCGCAAGAGCGGAACAGG<br>AAUUCGGAAAGGCAACAGCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUUCU<br>GAACUUUUCAAGACAGAAAUCAACACUGGCAACCGGAGAAUUCAGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUUGUCU<br>GGGACAAGGGAAAGAGACUUCGGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAU<br>GCCGAGGUCAACAUCGUCAAGAGAGACAGAAUCCAGACAGGAGGA<br>UUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGA<br>UCCGAAAGAAAGAGAGGACUGGGACCCGAAAGAAAGUACGGAGGAUUCGA<br>CAGCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCCGCAAAAGGUCCGAA<br>AAGGAAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGGUCAGGAACUGCUGGGAA<br>UCACAAUCAUUGGAAAGAGCAGCUUCGAAAGAACCCGAUCGACUU<br>CCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAAGGACCUGAUCauc<br>AAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAAACUGGAACACGGAAGAAAG<br>GAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAACGAAACUGGC<br>ACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUGUACCUUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAGCAGCUGU<br>UCGUCCAACAGCACAGCACUACCUUGGACGAAAUCAUCGAAACAGAU<br>CAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCUCCUGGCAGACGCAACCCUGGAC<br>AAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGACAGAACGCCGAUCAGAG<br>AACAGGCAGAAACAUCAUCCACCUUGUUCACACUGAACAAACCCUGGG<br>AGCACCGGCAGCAUUCAAAGUACUUCGACACAAACAUCGACAGAAAG<br>AGAUACACAAGCCACAAGGAAGUCCUGGACGCCAACACUGAUCCACC<br>AGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAAGAAUCGACCUGAGGCCAGCU<br>GGGAGGAGACGGAGGGAAGCCCGAAGAAAGAGAGAAAGGUUCUAG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 4 1】

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |       |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| C a s 9 mR<br>NA ORF<br>1 | AUGGAUAAAGAAACUCACAAUCGGGCUUGGAUAUCGGAACUAAUUCGG<br>UGGGUUUGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAA<br>GUUCAAGGUCCUGGGAAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAU<br>CUCAUCCGGAGCCUGUGUUUGACUCCGGCGGAAACCGCAGAAAGCGA<br>CCGGCUCAAACGUACCGGAGGGGACGCUACACCGGCGGAGAGAA<br>UCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUUUUUCGAAACGAAUUGGCAAAAG<br>GUCGACGACAGCUUCUUCACCGCCUGGAGAAUUCUUUCCUGGUGG<br>AGGAGGACAAGAAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGU<br>CGACGAAGUGGCGUACCAAGAAAGUACCGGACCAUCUACCAUCUG<br>CGGAAGAGUUUGGUUGACUCACUGACAAAGCCGACCCUCAGAUUGA<br>UCUACUUUGGCCUUGCCCAUAUGAUCAAUUCCGGGACACUUCCU<br>GAUCGAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAAUCUCCGACGUGGAUAAAGCUU<br>UUCAUUCAACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUUGAAGAAACC<br>CAAUCAAUGCUAGCGGCGUGCGAUGCCAAAGGCCAUCCUGUCGCGCCG<br>GCUGUCGAAGUCGGGGCGCCUCGAAACCCUGAUCCGACAGCUGCCG<br>GGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCCGGCAACUUUGAUCGUCUCAC<br>UGGGACUCACUCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGA<br>CGGAAGCUGCAACUCUCAAAGGACACCUACGACGACGACUUUGGAC<br>AAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUUCUUG<br>CCGCUAAGAACUUUCGGACGCAAUUUUGCUUGCCGAUUAUCCUGCG<br>CGUGAACACCGGAAAUAAACAAAGCGCGCUUAGCGCCUCGGAUGAUU<br>AAGCGGUACGACGAGCAUACACAGGAUCUCACGCGUCUCAAGCGC<br>UCGUGAGACAGCAACUCUGCCUGAAAAAGUACAAAGGAGAUUUUUCGA | 2 0 5 |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 2】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCAGUCCAAAGAAUGGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGGUAGC<br>CAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAGAUGG<br>ACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCU<br>CCGGAACACAGAGAACCCUUUGACAAACGGAUCCAUUCCCCACAGAU<br>CAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUUGGGCGCCAGGAGGACUUUU<br>ACCCAUUCUCAAGGACAAACGGGAAGAAAGAUAGAGAAAUAUCUGAC<br>GUUCCGC AUCCCCGUUUACGUGGGCCCCACUGGGCGCGGCAAUUCG<br>CGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAUAUCAGAGGAACCAUCACUCCUU<br>GGAUUUCGAGGAAGUUGGUAUAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUU<br>CAUCGAAACGAUGACCAACUUCGACAAAGAUUCUCCCAACGAGAG<br>GUGCUUCCUAAGCACAGCCUCCUUACGAAUAUCUACUGUCUACA<br>ACGAAACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAUUGAGGAAGCC<br>GGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAAGAAUUGUCGACUCUGCUG<br>UUCAAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUACAAGCAGCUUAAAGAGGACU<br>ACUUCAAAGAAAGUUCGAGUGUUUCGACUCACGUGGAUAUCAGCGGGU<br>GGAGGACAGAUUCAAACGCUUCGUGGGAACCUAUCAUGAUCUCCUG<br>AAGAUCAUCAAGGACAAAGGACUUCUUGACAAACGAGGAGAACGAGG<br>ACAUCUGGAAGAUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCG<br>CGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUUCGAC<br>GAUAAAGGUC AUGAAACACUACAGCGCGCGCGGUACACUGGUUGGG<br>GGCGCCUUCUCCGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGGGAUAAACAGAG<br>CGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUUGGAUGGCUUCGCUAAU<br>CGUAAACUUC AUGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGG |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGGACAUCCAAAGACACAAGUGUCGGACAGGGAGACUCACUCCA<br>UGAACACAUCGGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAAGGA<br>AUUCUGCAACUCUGAAGUGGUCGACGAGCUGGUAAAGGUC AUGG<br>GACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAA<br>CCAGACUACCCAGAGGGCCAGAAAACUCCCGCGAAGGAUGAAG<br>CGGAUCGAAGAAGGAUCAAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAG<br>AGCACCCGGUGGAAAACACGGCAGCUGCAGAACGAGAACUCUACCU<br>GUACUAUUUGCAAAUUGGACGGGACAUUAACGUGGACCAAGAGCUG<br>GACAUCAAUCGGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCAUCAUGUCCAC<br>AGUCCUUUCUGAAGGAUGACUCGUAUCGAUACAAAGGUGUUGACUCG<br>CAGCGACAAGAACAGAGGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCCGGAGGAG<br>GUCGUGAAGAAAGAUAGAAGAAUUAUCUGGGCGAGCUCUGA AUGCGA<br>AGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCACUAAAAGCCGAGCG<br>CGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUUGGAUUAUCAAAACGGCAG<br>CUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGGCGAGAUUUUG<br>ACUCCCGCAUGAACACUAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCG<br>GGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAANAAGCAACUUGUGCGGACUUU<br>CGGAAGGACUUUCAGUUUUAACAAAGUGAGAGAAUCAAACAUAAC<br>AUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUUGGUGGUAACCGCCCU<br>GAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGAC<br>UACAAGGUUUAACGACGUGAGGAAGAUAGCAAGUCCGAACAGG<br>AAAUCCGGGAAGCAACUGCGAANAUAUUUUUUAUCUCAAACAUAU<br>GAACUUUUUCAAAGACUGAAAUUAACGUGGGCCAAUGGAGAAAUACAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGAGGCCACUGAUCGAAACUAAACGGAGAAACGGGCGAAAUUCGUGU<br>GGACAAAGGGCAGGACUUUCGCAACUGUUCGCAAGUCCUCUUAU<br>GCCGCAAGUCAUAUUGUGAAGAAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGA<br>UUUUCAAAGGAUUCGAUCCUCCAAAGAGAAAUAAGCGACAAGCUCA<br>UUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAGAGAGUACGGAGGAUUCGA<br>UUCGCCGACUGUCGAUACUCCGUCCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAG<br>AAGGGAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAGAGCUGCUGGGGA<br>UUAACAUCAUUGGAACGAUCCUGGUUCGAGAGAAACCGGAUUGAUUU<br>CCUCGAGCGGAAGGUUACAAGGAGGUGAAGAGGAUCUGAUCauc<br>AAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGACUGGAAAUAUGGUCGGAAAGC<br>GCAUGCUUGGUUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGC<br>CUUGCCUAGCAAGUACGUCACUUCUUCUUAUCUUGCUUCGCACUAC<br>GAAAAACUCAAAGGUACCGGAAGAUAAAGAACAGAGCAGCUUU<br>UCGUGGAGCAGCACAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCAUCGAACAAAU<br>CUCCGAGUUUUCAAAGCGGUGAUCUCCGCGACGCCAACCUCCGAC<br>AAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAG<br>AACAGGCCGAGACAUUAUCCACUUGUACCCUGACUAAACUUGGG<br>AGCCCCAGCCGCCUUCAGUAUUAUUGAUACUACUUAUCGAUCGCAAA<br>AGAUACACGUCACCACAGGAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACC<br>AAAGCAUACUGGACUCUACGAACUAGGAUCGAUCUGUGCGAGCU<br>GGGUGGCGAUGGGGUGGAUCUCCGAAAAAGAGAGAAAGGUGUAA<br>UGA |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 5】

|     |           |
|-----|-----------|
|     | 2 0 6 - 2 |
|     | 1 2       |
| 未使用 |           |
|     |           |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 6】

|                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| C a s 9 のアミ<br>ノ酸配列 (N L<br>S なし) | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRRKNRICYLQEI FSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKD TYDDDDLD<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HILGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGT YHDLL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIERLKT YAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPA I KKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHI VPSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINNYIIIAIDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D<br>YK V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R | 213 |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |             |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVLSMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHY<br>EKLKGSPEQKQLFVEQIKHYYLDEII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD | 214~2<br>21 |
|  | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 4 8】

|                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2つの核局在化<br>シグナルをC末端<br>アミノ酸とし<br>て有するCa <sup>2+</sup><br>9のアミノ酸配<br>列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEEPNINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDITYDDLD<br>NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HIGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPHUSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD<br>RKDFQFYKVRREINNYHHHDAIYLNAAVVGTAIHKYPKLESEFVYGD<br>YKVVYDVRKMKIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 222 |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50



【表 20 - 49】

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|                        | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAVVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFKEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLYLASHY<br>EKLKGSPEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDA TLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKKRKKVD<br>GSPKKRKKVDSG | 223~230 |
|                        | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 231     |
| T7プロモーター               | TAATACGACTCACTATA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 232     |
| ヒトベクター-<br>ロビン 5' UTR  | ACATTTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCAGTAGCAACCTCAACACAGA<br>CACC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 233     |
| ヒトベクター-<br>ロビン 3' UTR  | GCTCGCTTTTCTTGCTGTCCAAATTTCTATTTAAAGGTTCCTTTGTTC<br>CTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGCCCTTGAGC<br>ATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC                                                                                                                                                                                                                                  | 234     |
| ヒトアルファ-<br>グロビン 5' UTR | CATAAACCTGGCGGCTCGGGCCCCGGGCACTCTTCTGTGTCCTCCAC<br>AGACTCAGAGAGAACCCACC                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |

10

20

30

40

50

【表 20 - 50】

|                                                                                    |                                                                                                                                               |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ヒトアルファ-<br>グロビン 3'<br>UTR                                                          | GCTGGAGCCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCCTTGGGGCTCCCCCC<br>AGCCCCCTCCTCCCCCTTCTCTGCACCCGTTACCCCCGTTGGTCTTTGAAT<br>AAAGTCTGAGTGGCGGC                  | 235 |
| <i>Xenopus</i><br><i>laevis</i> ベ<br>ータ-グロビン<br>5' UTR                             | AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC                                                                                                                 | 236 |
| <i>Xenopus</i><br><i>laevis</i> ベ<br>ータ-グロビン<br>3' UTR                             | ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATAC<br>CAACTTACACTTTACAAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCTG<br>TATCTGCTCCTAATAAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT | 237 |
| ウシ成長ホルモ<br>ン 5' UTR                                                                | CAGGGTCTCTGTGGACAGCTCACCCAGCT                                                                                                                 | 238 |
| ウシ成長ホルモ<br>ン 3' UTR                                                                | TTGCCAGCCCATCTGTTGTTTGGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACC<br>CTGGAAGGTGCCACTCCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAA<br>TTGCATCGCA                              | 239 |
| <i>Mus mus</i><br><i>culus</i> ヘル<br>グロビンアルフ<br>ア、成人鎖 I<br>(Hba-a<br>1)、3' UT<br>R | GCTGCCCTTCTGGGGGGCTTGCCTTCTGGCCCATGCCCTTCTTCTCTC<br>CCTTGCACTGTACCTCTTGGTCTTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAA<br>G                                       | 240 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 1】

|                             |                                                                                                                                                                   |       |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| HSD17B4<br>5' UTR           | TCCCCGAGTCGGGGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGGTGTGTGTGG<br>TTGCAGGCCCTATTC                                                                                                  | 2 4 1 |
| TTRを標的と<br>するG282が<br>イドRNA | mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAmGmUmAmGmA<br>mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmU<br>mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmU<br>mGmCmU*mU*mU*mU | 2 4 2 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 2】

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HSDの5' U<br>TR、配列番号<br>204に対応す<br>るORF、Ko<br>zak配列、お<br>よびALBの<br>3' UTRを有<br>するCas9転<br>写産物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAATACA<br>GCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAT<br>CACAGACGAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCCCTGGGA<br>AACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC<br>TGTTGCACAGCGGAGAAACAGCAGAAACAAGACTGAAGAGAAC<br>AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAACTCTGCTACCTG<br>CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCCGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAAGACAAGAAAGCA<br>CGAAGAACAACCGATCTTCGGAACAATCGTCGACGAAGTCGCATAC<br>CACGAAAAGTACCCGACAACTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCG<br>ACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC<br>ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG<br>AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCC<br>AGCATACAACCAAGCTGTTTCGAAGAACAACCGATCAACGCAAGCGG<br>AGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAAACAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAGAACG<br>GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA<br>TCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAG<br>CGACGCATTCCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATC<br>ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAC | 243 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACGAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAGGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>TAGGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCATCA<br>AGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGACGGAAACAGAAAGAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACA<br>TTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACCTTCTACCCGTTCCCTGAAGGA<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTAC<br>TAGCTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGA<br>CAAGAAGAGCGAAGAAACAAATCAACCCGTGGAACTTCGAAGAAAGT<br>CGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACA<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAGAAAGGTCCCTGCCGAAGCACA<br>GCCGTGTACGAAATACTTCACAGTCTACAAAGAACTGACAAAGGT<br>CAAGTACGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGA<br>GAACAGAAAGAGGCATTCGTGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAA<br>AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA<br>ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAC<br>GCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAAGAAAGAAACGAAGACATCCTGGAAAGACAT<br>CGTCCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA<br>AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCAATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAA<br>GCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GACTTCCCTGAAGAGCGGACGGATTCCGCCAAACAGAAACTTCATGCGGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGC<br>ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCCGCCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACACAGAAG<br>GGACAGAAGAAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAA<br>TCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAA<br>CACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCCAGAAC<br>GGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGA<br>GCGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGA<br>CGACAGCATCGACAAACAAGGTCTGTACAAAGAACGACAAAGAACAGA<br>GGAAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACTGACAAAGGCAGAGAGGAGGACTGAGCGAA<br>CTGGACAAAGGCAGGATTCAATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGAC<br>AGATCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACAC<br>AAAGTACGACGAAACCGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCCACGCAACGACGC<br>ATACCTGAACGCGAGTCGTGCGAACACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTCAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGA<br>CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAAGGTCAACATC<br>GTCAAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAGCA<br>TCC TGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAGGA<br>CTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAAGGTGGAAGGAAAGGAAAGAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAG<br>AAGCAGCTTCGAAAGAACCCGATCGACTTCTTGGAAAGCAAGGGA<br>TACAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA<br>GCC TGTTCGAACTGGAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAAACCTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAA<br>GCCCGGAAGACAAAGAACAGAACAGCAGCTGTTCGTGGAACAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAG<br>AGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCTTGAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGCGAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAA<br>AGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAAGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 6】

|  |                                                                                                                                                                                                       |    |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  | AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGAT<br>CAATAGCCTTATTTCATCTCTTTTTCCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAA<br>CACCCGTGCTAAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTT<br>TCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG |    |
|  |                                                                                                                                                                                                       | 10 |
|  |                                                                                                                                                                                                       | 20 |
|  |                                                                                                                                                                                                       | 30 |
|  |                                                                                                                                                                                                       | 40 |
|  |                                                                                                                                                                                                       | 50 |



【表 2 0 - 5 7】

|                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HSDの5' U<br>TR、配列番号<br>204に対応す<br>るORF、およ<br>びALBの3'<br>UTRを有する<br>C a s 9 転写産<br>物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCTTATTCCGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCG<br>GACTGGACATCGGAACAACACAGCGTCGGATGGCAGTCATCACAGA<br>CGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCCCTGGGAACACA<br>GACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTCG<br>ACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAG<br>AAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGA<br>ATCTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACA<br>GACTGGAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAAGAACAGACAAAGACGAAAG<br>ACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAA<br>AAGTACCCGACAAATCTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCA<br>CAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACAT<br>GATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAAGGAGACCTGAACCCG<br>GACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACAT<br>ACAACCAAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA<br>CGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTG<br>GAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGT<br>TCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAA<br>GAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAG<br>GACACATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAG<br>ACCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAGAACCTGAGCGACGC<br>AATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAG<br>GCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACC | 244 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 8】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGA<br>AAAGTACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA<br>GGATACATCGACGGAGAGCAAGCCAGGAAGAAATCTACAAAGTTCA<br>TCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAACTGCTGGT<br>CAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGAC<br>AACGGAAGCATCCCGCACCCAGATCCACTGGAGAACTGCACGCCAA<br>TCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACAAACAG<br>AGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTC<br>GGACCGCTGGCAAGAGGAAACACAGCAGATTCCGATGGATGACAAGAA<br>AGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGATCGTCGA<br>CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTC<br>GACAAGAACCTGCCGACCGAAACGAAAGGTCCCTGCCGAAACACAGCCCTGC<br>TGTAACGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACTGACAAAGGTCAAGTA<br>CGTCACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCA<br>CAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAATGCTT<br>CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCCAAGC<br>CTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACT<br>TCCTGGACACAGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCT<br>GACACTGACACTGTTCGAAAGACAGAGAAATGATCGAAAGAAAGACTG<br>AAGACATACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGA<br>AGAGAAAGAAATACACAGGATGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGAT<br>CAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTC |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 5 9】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CTGAAGAGCGACGGATTTCGCCAAACAGAAACTTCATGCGAGCTGATCC<br>ACGACGACAGCCTGACATTC AAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGT<br>CAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAACTGGCA<br>GGAAGCCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTGG<br>TCGACGAACCTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGAAAACAT<br>CGTCAATCGAAAATGGCAAGAGAAAAC CAGACAAACAGAGAGGACAG<br>AAGAACAGCAGAGAAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGG<br>AACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAA<br>GCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGA<br>GACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACT<br>ACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG<br>CATCGACAAACAAGGTCCCTGACAAAGAAGCGACAAAGACAGAGGAAAG<br>AGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGAAGAACT<br>ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTT<br>CGACAACTGTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGAC<br>AAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCA<br>CAAGCACGTCGCCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAAACAAAGTA<br>CGACGAAAACCGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTG<br>AAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACA<br>AGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCACGCAACGACGCAATACCT<br>GAAAGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAAGCTG<br>GAAAGCGAAATTCGTCTACGGAGACTCAAGGTCTACGACGTCAGAA<br>AGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAA |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 60】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| GTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATC<br>ACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAA<br>ACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGACAAAGGGAAGAGACTTCGC<br>AACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAG<br>AAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAGCATCCTGC<br>CGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGA<br>CCGAAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGC<br>GTCCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCTGA<br>AGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAGCAG<br>CTTCGAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAAGCAAGGGATACAAAG<br>GAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGT<br>TCGAACTGGAAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGA<br>ACTGCAGAAAGGGAACCGAACTGGCACCTGCCGAGCAAGTACGTCAAC<br>TTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAAGCCCGG<br>AAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAAACAGCACAAAGCACTA<br>CCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGAGTCTC<br>ATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCTCTGAGCGCATACAAAC<br>AGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAACATCATCCA<br>CCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAGGTAC<br>TTCGACACAAACATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAG<br>TCCCTGGACGCAACACTGTATCCACAGAGCATCACAGGACTGTACGA<br>AACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC<br>CCGAAGAAAGAGAAAGGTCCTAGCTAGCCATCACATTTTAAAGCA |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 1】

|  |                                                                                                                                                                                              |       |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|  | TCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCACACCCCT<br>GTCATAAAAAACATAAAATTTCTTTTAATCATTTTGGCCTCTTTTCTCTG<br>TGCTTCAATTATAAAAAATGGAAGAACCTCGAG |       |
|  | 未使用                                                                                                                                                                                          | 2 4 5 |

10

20

30

40

50

【表 20-62】

|                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSDの5' UTR、配列番号245に対応するZORF、Kozak配列、およびALBの3' UTRを有するCas9転写産物 | GGGTCCCGCAGTCGGGCTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCTTATTCGGATCTGCCACCATGGATAAGAACTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACATAATCCGTGGGTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAAGATTCAAGTCCCTGGGAAACCGGATAGACACAGCATCAAGAGAAATCTCATCGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAAGGACCCGGCTCAAACGTACCGGAGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGTGGACGCACAGCTTCTCCACCGCCTGGAAGAAATCTTTCCTGGTGGAGGACAAAGAACATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAAGTGGCGTACACGAAAGTACCGGACCATCTACCATCTGCGGAAAGAAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAAGCGCACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAAATTCGGCGGACACTTCTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTGGAAGAAACCCAAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGGAAGTCGGCGCTCGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAAATTCAAGTCCAAATTTGACCTGGCCGAGGACGGCGAAGCTGCAACTCTCAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGGCGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTTCGGACCAATCTTGTCTCGGATATCTCTGCGGTGAACACCGAATAACCAAGCGCCGCTTAGCGGCTCGATGATTAAAGCGGTACGACGAGC |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ATCACAGGATCTCAGCGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACT<br>GCCTGAAAAGTACAAGGAGATTCTTCTCGACCGAGTCCAAAGATGGG<br>TAGGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATA<br>AGTTCATCAAGCCAACTCCTGGAAGATGACGGAACCGAAGAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCCAACACAGAGAAC<br>TTTGACAACGGAAGCATTCACACCCAGATCCATCTGGGTGAGCTGC<br>ACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCTCAAGGA<br>CAACGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCGGCATCCCGTAT<br>TACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTTCGGCTTCGCGTGGATGA<br>CTAGAAAATCAGAGGAACCATCACTCCTTGGAAATTCGAGGAAGT<br>TGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAACTCCTCATCGAACGAATGACC<br>AACTTCGACAAAGAACTCTCCCAACGAGAAAGGTGCTTCCTAAGCACA<br>GCCCTCCTTTACGAAATACCTTCACTGTCTACAAAGAACTGACTAAAGT<br>GAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGA<br>GAACAGAAAGAAAGCGATTGTGATCTGTGTTCAAGACCAACCGCA<br>AGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGA<br>GTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAAC<br>GCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATAT<br>CGTCCGTGACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAG<br>AGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAATGAAC<br>AACTCAAGCGCCCGGTACACTGTTGGGGCCGCCCTCTCCCGCAA<br>GCTGATCAACCGGTATTCGGGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GATTTCCCTCAAAATCGGATGGCTTCGGCTAAATCGTAACCTTCATGCAGT<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGC<br>ACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCCTCCATGAACACATCGCGAAT<br>CTGGCCGGTTCCGCCGGGATTAAAGAAAGGAAATCCTGCAAACTGTGA<br>AGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGA<br>GAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAACCCAGACTACCCAGAAAG<br>GGCCAGAAGAACTCCCGGGAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAA<br>TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAATA<br>CACGCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTCTACCTGTACTATTTGCATAAT<br>GGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGT<br>CTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGA<br>TGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGA<br>GGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGA<br>AGAAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAG<br>AAAGTTTGACAAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGACTCTCAGAG<br>CTGGATAAGGCTGGATTTCATCAAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGC<br>AGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAAACAC<br>TAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATT<br>ACCTGAAAAGCCAAACTTGTTGTCGGACTTTCGGGAAGGACTTTCAGT<br>TTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACCGGCATGACGC<br>ATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCT<br>AAACTTGAAATCGGAGTTTGTGTACGGGAGACTACAAGGTCTACGACG<br>TGAGGAAGATGTAGCCAAAGTCCGGAACAGGAAATCGGGAAAGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 6 5】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| TGCGAAATACTTCTTTTACTCAAAACATCATGAAC TTCTTCAAGACT<br>GAAATTACGCTGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCG<br>AAACTAACGGAGAAACGGGGGAAATCGTG TGGGACAAAGGCGAGGGA<br>CTTCGCAACTGTTCGCAAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATT<br>GTGAAGAAAACCGAAGTGCAAAACGGCGGATT TTTCAAAGGAATCGA<br>TCC TCCCAAAGAGAAATAGCGACAAAGCTCATTTGCACGCAAGAAAGA<br>CTGGGACCCGGAAGTACGGAGGATTTCGATTCCGCCACTGTCCGA<br>TACTCCGTCCCTCGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCAAGA<br>AGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGATTACCATCATGGAACG<br>ATCCTCGTTCGAGAAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGCCGAAGGGT<br>TACAAAGGAGGTGAAGAAAGGATCTGATCATCAAACTGCCCAAGTACT<br>CACTGTTCGAACTGGAAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGC<br>CGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCCTAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGT<br>CACCGGAAGATAACGAACAGAAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCAAA<br>GCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAG<br>CGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCCTGTCCGCCCT<br>ACAAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAAACAGGCCGAGAAACAT<br>TATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCCTTC<br>AAGTACTTCGATAC TACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCACCA<br>AGGAAGTCTCGGACCGGACCCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACT<br>CTACGAAAC TAGGATCGATCTGTGCGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGC<br>GGTGGATCC TACCCATACGACGTGCCCTGACTACGCCCTCCGGAGGTG |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 6】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GTGGCCCCAAGAAGAAACGGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACAATT<br>TAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAATGAAG<br>ATCAA TAGCTTATTCAATCTCTTTTCTTTTTCGGTTGGTGTAAGCC<br>AACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTTTAATCATTTTGCCTCT<br>TTTCTCTGTGCTTCAATTATAAATAATGGAAAGAACCTCGAG |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 7】

|                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HSDの5' U<br>TR、配列番号<br>245に対応す<br>るORF、およ<br>びALBの3'<br>UTRを有する<br>Cas9転写産<br>物 | 247<br>GGGTCCCCGAGTCGGCGGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCTATGGATAAGAACTACTCGATCG<br>GGCTGGATACTGGAACTAATTCCGTGGGTGGGCGAGTGTACCGGA<br>TGAATACAAAGTGCCGTCCTCCAAAGTTCAAGTCTCTGGGGAACACC<br>GATAGACACAGCATCAAGAAGAACTCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTG<br>ACTCCGGCGAAACCGCAGAAAGCACCAGGCTCAACGTAACCGGAG<br>GCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAA<br>ATCTTTTCGAACGAAATGGCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACC<br>GCTGGAAGAACTCTTCCCTGGTGGAGGAGGACAAAGCATGAACG<br>GCATCCTATCTTTGGAAACATCGTTGGACGAAAGTGGCGTACCAAGAA<br>AAGTACCCGACCATCTACCATCTCGGGAAGAAAGTTGGTTGACTCAA<br>CTGACAAAGGCGGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATAT<br>GATCAAAATTCGGCGGACACTTCCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCT<br>GATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTTCAATTCAACTGGTGCAGACCT<br>ACAACCAACTGTTCGAAGAAACCCAAATCAATGCCAGCGCGTCTGA<br>TGCCAAAGGCCATCCCTGTCCGCCCGGCTGTCTGAAAGTCGCGGCGCTC<br>GAACCTGATCGCACAGCTGCGCGGAGAGAAAGAACGGACTTT<br>TCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAA<br>GTCCAAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAG<br>GACACCTACGACGACGACTTGGACAAATTTGCTGGCACAAATTTGGCG<br>ATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGC<br>AATCTTGTCTCCGATATCTCTGGCGGTGAACACCGAAATACCAAA<br>GCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAAGCGGTACGACGAGCATCAC |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 20 - 68】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGATCTCAGCGTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCCTGA<br>AAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAAATGGGTACGCA<br>GGGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA<br>TCAAGCCAAATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACCGAAGAACTGCTGGT<br>CAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAACACAGAGAACCTTTTGAC<br>AACGGAAGCATTCCACACCCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCA<br>TCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTTCCCTCAAGGACACACCG<br>GGAAAAGATCGAGAAAAATTTCTGACGTTCCGCAATCCCGTATTACGTG<br>GGCCCACTGGCGCGGGCAATTTCGGGCTTCGGGTGGATGACTAGAA<br>AATCAGAGGAACCATCACTCCTTGGAAATTTTCGAGGAAGTTGTGGA<br>TAAGGGAGCTTCGGGCACAAATCCTTCATCGAACGAAATGACCAACTTC<br>GACAAGAATCTCCCAACGAGAAAGGTGCTTCCCTAAGCACAGCCTCC<br>TTTACGAATACTTCACTGTCTACAAACGAACTGACTAAAGTGAAATA<br>CGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAAGCGATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCCGCAAGGTGA<br>CCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTC<br>CGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCG<br>CTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACT<br>TCCTTGACAACGAGGAGAAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCT<br>GACCTTGACCCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTT<br>AAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTGATGAAACAACTCA<br>AGCGCGCGCGGTACACTGGTTGGGGCGCGCTCTCCCGCAAGCTGAT<br>CAACGGTATTTCGGGATAAAACAGAGCGGTAACAACTATCCTGGATTTC |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 6 9】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CTCAAATCGGATGGCTTCGGCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCC<br>ACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAAGT<br>GAGCGACAGGGAGACTCACTCCATGACACACATCGCGAATCTGGCC<br>GGTTCGCCGGCGATTAAAGAGGGAATCCTGCAAACTGTGAAGGTGG<br>TGGACGAGCTGGTGAAGGTCAATGGGACGGCACAAACCGGAGAAATAT<br>CGTGATTGAAATGGCCCGAGAAACCAGACTACCCAGAAAGGCCAG<br>AAGAACTCCCGGAAGGATGAAGCGGATCGAAGAGGAATCAAGG<br>AGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGAGACCCGGTGGAAACACGCA<br>GCTGCAGAACGAGAAAGCTCTACCTGTACTATTTCGAAAAATGGACGG<br>GACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATT<br>ACGACGTGGACCAACATCGTTCCACAGTCCTTTCCTGAAGGATGACTC<br>CATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAAGAACAGAGGGAAG<br>TCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCTGTGAAGAGATGAAGAAAT<br>ACTGGCGGCAGCTCCTGAAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTT<br>TGACAAATCTCACTAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGAT<br>AAGGCTGGATTTCATCAACAGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATT<br>CCAAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATA<br>CGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGTGATTACCCCTG<br>AAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAAGGACTTTCAGTTTTACA<br>AAGTGAGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCT<br>CAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAAGTACCCATAAACTT<br>GAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGA<br>AGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGGAA |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 0】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ATACCTCTTTTAACTCAAAACATCATGAACCTTCTTCAAGACTGAAATT<br>ACGCTGGCCAAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTA<br>ACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGC<br>AACTGTTCCGAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAG<br>AAACCGAAGTGCAACCGGCGGATTTTCAAAAGGAATCGATCCTCC<br>CAAAGAGAAATAGCGACAAAGCTCATTTGCACGCAAGAAAGACTGGGA<br>CCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTTCGCATACTCC<br>GTCCTCGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCAAGAAAGCTCA<br>AATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGATTACCATCATGGAACGATCCTC<br>GTTGAGAGAAACCCGATTGTATTTCTGGAGGCGAAGGGTTACAAG<br>GAGGTGAAGAAAGGATCTGATCATCAAACTGCCCAAGTACTCACTGT<br>TCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGA<br>ACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCTTGCCCTAGCAAGTACGTCAAC<br>TTCCCTCTATCTTGCTTCGCCACTACGAGAAACTCAAAGGTCACCCGG<br>AAGATAACGAAACAGAACGAGCTTTTCTGTGGAGCAGCACAAGCATTA<br>TCTGGATGAAATCATCGAAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAAGCGCGTG<br>ATCCTGCCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCTGTGCGGCTACAAATA<br>AGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA<br>CTTGTTCAACCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCCTTCAAGTAC<br>TTCGATACTACTATCGACCCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAG<br>TTCGTGGACGCGACCCCTGATCCACCACAAAGCATCACTGGACTCTACGA<br>AACTAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGA<br>TCCTACCCCATACGACGTGCCCTGACTACGCCCTCCGGAGGTGGTGGCC |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 1】

|  |                                                                                                                                                                                                                                               |                  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|  | CCAAGAGAAACGGAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAG<br>CATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAATGAGATCAAT<br>AGCTTATTTCATCTCTTTTCTTTTTCGGTTGGTGTAAAGCCAAACACC<br>CTGTCATAAAACATATAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTTCTC<br>TGTGCTTCATTAATAAATAATGGAAAGAACCTCGAG |                  |
|  | 未使用                                                                                                                                                                                                                                           | 2 4 8 - 2<br>5 1 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 2】

|                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |       |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 一般的にヒトで<br>頻繁に使用され<br>る最小ウリジン<br>コドンを含む<br>C a s 9   O R<br>F、1 2. 7<br>5%のU含有量 | ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCG<br>TGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAA<br>GTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAAGAAC<br>CTGATCGGGGCCCTGCTGTTCCACAGCGGCCGAGACCGCCGAGGCCA<br>CCAGACTGAAGAAACCGCCAGAAAGAAATACACCAAGAAAGAA<br>CAGAAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAG<br>GTGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCTGCTGG<br>AGGAGGACAAAGAACGACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGT<br>GGACGAGGTGGCCTACCAAGAGAAAGTACCCCACTATACCACTG<br>AGAAAGAAAGCTGGTGGACAGCAACCGACAAAGGCCGACCTGAGACTGA<br>TCTACCTGGCCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCT<br>GATCGAGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGTGGACAAAGCTG<br>TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTCCGAGGAGAAC<br>CCATCAAGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAG<br>ACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC<br>GGCGAGAAAGAAACGGCCCTGTTGGGCAACCTGATCGCCCTGAGCC<br>TGGGCTGACCCCACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGA<br>CGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGAC<br>AACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGG<br>CCGCCAAGAACTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG<br>AGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATC<br>AAGAGATACGACCGAGCAACCAAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCC<br>TGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTCGA | 2 5 2 |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 7 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGCCAGC<br>CAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGG<br>ACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCT<br>GAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAAACGGCAGCATCCCCACAGATC<br>CACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCT<br>ACCCCTTCTGAAGGACAAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGAC<br>CTTCAGAAATCCCCCTACTACGTGGGCCCTTGGCCAGAGGCCAACAGC<br>AGATTCCGCTGGATGACCAAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCT<br>GGAACCTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTT<br>CATCGAGAGAAATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAAG<br>GTGCTGCCCAAGCACAGCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACA<br>ACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCC<br>CGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTG<br>TTCAGAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACT<br>ACTTCAAGAAATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGCGT<br>GGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAACGACCTGCTG<br>AAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACACAGAGGAGAACGAGG<br>ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCCTGACCCCTGTCGAGGACAG<br>AGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACTGTTCTCGAC<br>GACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAAAGATACACCGGCTGGG<br>GCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAG<br>CGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGTGAAGCGAGCGGCTTCGCCAAC<br>AGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 4】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGACATCCAGAAAGGCCCAGGTGAGCGGGCCAGGGCGACAGCCCTGCA<br>CGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCGCCCATCAAGAGGGC<br>ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG<br>GCAGACACAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAA<br>CCAGACCACCCAGAAAGGGCCAGAAACAGCAGAGAGAGAGAAATGAAG<br>AGAAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGG<br>AGCACCCCGTGGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCT<br>GTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACAATGTACGTGGACCAAGGAGCTG<br>GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCAATCGTGCCCC<br>AGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCAG<br>AAGCGACAAAGAAACAGAGGCAAGAGCGACAACTGCTGCCAGCGAGGAG<br>GTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCA<br>AGCTGATCAACCCAGAGAAAGTTCTGACAACTGACCAAGGCCGAGAG<br>AGCGGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAAGGCCCGCTTTCATCAAGAGACAG<br>CTGGTGGAGACCAAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAGATCCTGG<br>ACAGCAGAAATGAACACCAAGTACGACGAGAAACGACAAAGCTGATCAG<br>AGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTC<br>AGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGAGAGAGATCAACAACTACC<br>ACCACGGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCT<br>GATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGAC<br>TACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAAGAGCGGACAGG<br>AGATCGGCAGAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCAT<br>GAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCAGA |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 75】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGT<br>GGGACAAAGGCGAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCAT<br>GCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGC<br>TTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGA<br>TCGCCAGAAAGAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGA<br>CAGCCCCACCGTGGCTTACAGGCTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAG<br>AAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCA<br>TCACCATCATGGAGAGAAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTT<br>CCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGACCTGATCATC<br>AAGCTGCCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGA<br>GAATGCTGGCCAGCCGCGGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGC<br>CCTGCCCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTAC<br>GAGAAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAACGAGCAGAGCAGCTGT<br>TCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT<br>CAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC<br>AAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAAGCACAGAGACAAAGCCCATCAGAG<br>AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCTGACCAACCTGGG<br>CGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACAGAAAG<br>AGATACACCCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACC<br>AGAGCATCACCGGCTGTACGAGACCAAGATCGAACCTGAGCCAGCT<br>GGCGGGCGACGGCGGCGGACGCCCAAGAAAGAGAAAGGTGTGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 6】

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HSDの5' U<br>TR、配列番号<br>252に対応す<br>るORF、Ko<br>zak配列、お<br>よびALBの<br>3' UTRを有<br>するCas9転<br>写産物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGGTCCAGCGGCTCTGTGTTGTTGTTGTTGTTG<br>TCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGTACA<br>GCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGAT<br>CACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGC<br>AACACCGACAGACACAGCATCAGAAGAACCTGATCGGCCGCCCTGC<br>TGTTCCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAAGACTGAAGAGAAC<br>CGCCAGAAAGAAATACACCAAGAAAGAAAGAAAGAAATCTGCTACCTG<br>CAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTGGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCTGTGGAGGAGGACAAAGAACCA<br>CGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTAC<br>CACGAGAAAGTACCCCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAAGCTGGTGG<br>ACAGCACCGACAAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGGCCCTGGC<br>CCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCTGTATCGAGGGCGACCTG<br>AACCCCGACAAACAGCGACGTGGACAAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGC<br>AGACCTACAAACCAGCTGTTCCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGG<br>CGTGGACGCCAAGGCCATCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCCCGGCGAGAAAGAAACG<br>GCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCCTGACCCCCAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGGCCCAGA<br>TCGGCGACCCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAG<br>CGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATC<br>ACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGC | 253 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACGAGACCTGACCCCTGCTGTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCT<br>GCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAACGGC<br>TACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACA<br>AGTTCAATCAAGCCCATCCTGGAGAAAGATGGACGGCACCGAGGAGCT<br>GCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACC<br>TTCGACAAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACTGGGCGGAGCTGC<br>ACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCTCTGAAGGA<br>CAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAAATCCCCTAC<br>TACGTGGGCCCTGGCCAGAGGCCAACAGCAGATTCCGCTGGATGA<br>CCAGAAAGAGCGGAGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGT<br>GGTGACAAAGGGGCCAGCGGCCAGAGCTTCATCGAGAGAAATGACC<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAGAGGTGCTGCCCAAGCACAA<br>GCCGTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTGTACAACGAGCTGACCAAGGT<br>GAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTCTGAGCGGC<br>GAGCAGAAAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAAGACCACAGAA<br>AGGTGACCGGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGA<br>GTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGCGGTGGAGGACAGATTCAAC<br>GCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACAT<br>CGTGCTGACCCCTGACCCCTGTTCCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAG<br>AGACTGAAGACCTACGCCCCACCTGTTCCGACGACAAAGGTGATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAA<br>GCTGATCAACGGCATCAGAGACAAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

【表 20 - 78】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC<br>CCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAAC<br>CTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAAGGGCATCCTGCAGACCGTGA<br>AGGTGTTGACGAGCTGTTGTAAGGTGATGGGCAGACACAGCCCGA<br>GAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAAACCAGACCACCCAGAAG<br>GGCCAGAAAGAACAGCAGAGAGAGAAATGAAAGAAATCGAGGAGGGCA<br>TCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAA<br>CACCCAGCTGCAGAACGAGAGAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAC<br>GGCAGAGACATGTACGTGGACCCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGA<br>GGGACTACGACGTGGACCAACATCGTGGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGA<br>CGACAGCATCGAACAAAGGTGCTGACCAAGAAAGCAAGAAACAGA<br>GGCAAGAGCGACAAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAG<br>AAAGTTCGACAACTGACCAAGGCCGAGAGAGCGGCCCTGAGCGAG<br>CTGGACAAAGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAAGAC<br>AGATCACCAAGCACGTGGCCCCAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACAC<br>CAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCAGAGAGAGGTGAAGGTGATC<br>ACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCAACACGCCACCGACGC<br>CTACCTGAACGCCGTGGTGGCACCGCCCTGATCAAGAAAGTACCCC<br>AAGCTGGAGAGCGGAGTTCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACG<br>TGAGAAAGATGATCGCCAAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 7 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCAAGACC<br>GAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCG<br>AGACCAACGGCGAGACCGCGAGATCGTGTGGACAAAGGCGAGAGA<br>CTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATC<br>GTGAAGAAACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTTCAGCAAGGAGAGCA<br>TCCTGCCCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGA<br>CTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCCTGGCC<br>TACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGGTGGAGAAAGGCAAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTGAAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAG<br>AAGCAGCTTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCTTGGAGGCCAAGGGC<br>TACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACA<br>GCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAAATGCTGGCCAGCGC<br>CGGCGAGCTGCAGAAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCCAGCAAGTAC<br>GTGAACCTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAAGCTGAAGGCA<br>GCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCTGTGAGCAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAG<br>AGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAGGTGCTGAGCGCCT<br>ACAAACAGCACAGAGACAAGCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCCTTC<br>AAGTACTTCGACACCCACCATCGACAGAAAGAGATACACCCAGCACCA<br>AGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGCATCACCGGCT<br>GTACGAGACCCAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGG<br>GGCAGCCCCAAGAGAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 0】

|  |                                                                                                                                                                                                        |                  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|  | AAAGCATCTCAGCCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGAT<br>CAATAGCCTTATTCACTCTTTTTCCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAA<br>CACCGTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTTAAATCATTTTGCCTCTTT<br>TCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | 2 5 4 ~ 2<br>5 5 |
|  | 未使用                                                                                                                                                                                                    |                  |

10

20

30

40

50



【表 20-81】

|                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CleanCap (商標) とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとしてのAGG、HSDの5' UTR、配列番号204に対応するORF、Kozak配列、およびALBの3' UTRを有するCass9転写産物 | AGGTCCTCCGACAGTCGGCGGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAAGTACA<br>GCATCGGACTGGACATCGGAACAACACAGCGTCGGATGGGCAGTCAT<br>CACAGACGAATACAAGTCCCGAGCAAGAAAGTTCAAGTCCCTGGGA<br>AACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGC<br>TGTTTCGACAGCGGAGAAACACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC<br>AGCAAGAAAGATACACAAAGAAAGAAAGAAATCTGTCTACCTG<br>CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTTCGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGTCGAAAGAAAGCAAGAAAGCA<br>CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATAC<br>CACGAAAGTACCCGACAAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGTGTG<br>ACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC<br>ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGTATCGAAGGAGACCTG<br>AACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTTCATCCAGCTGTGTC<br>AGACATACAACCAAGCTGTTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCCAAGCGG<br>AGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGAACG<br>GACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA<br>TCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTTCTGGCAGCAAAAGAACCTGAG<br>CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATC<br>ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAAC |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACCAGGACCTGACACTGCTGTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAGGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAAGCAAGCAAGCGGA<br>TACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACA<br>AGTTCATCAAGCCGATCCTGTGAAAAGATGGACGGAACAGAGAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACA<br>TTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGCCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGA<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTAC<br>TACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCCGATGGATGA<br>CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAAGT<br>CGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACA<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCGCAACGAAAAGTCTCTGCCGAAGCACA<br>GCCGTGCTACGAAATACCTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGGT<br>CAAGTACGTCAACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGA<br>GAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAA<br>AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA<br>ATGCTTCGACAGCGTCGAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAC<br>GCAAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAACGAAGACATCCTGGAAGACAT<br>CGTCCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA<br>AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCCGACGACAAAGGTCAATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAAGAA<br>GCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 83】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GACTTCCCTGAAGAGCGGACGGATTTCGCAAAACAGAAAACCTTCATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAGGAAGACATCCAGAAGGC<br>ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGGAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACAGAAAG<br>GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGA<br>TCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAA<br>CACACAGCTGCAGAAACGAAAGCTGTACCTGTACTACTACCTGCAGAAC<br>GGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGA<br>GGGACTACGACGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGA<br>CGACAGCATCGACAAACAAAGGTCTCTGACAAAGAAAGCGACAAAGAACAGA<br>GGAAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCTGTCAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAA<br>CTGGACAAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGAC<br>AGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACAC<br>AAAGTACGACGAAAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCGCACACGACCG<br>ATACCTGAACGCAGTCGTGGAAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 4】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGA<br>CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATC<br>GTCAAAGAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCA<br>TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGA<br>CTGGGACCCGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCTGTGTCGTCGCAAAAGGTGCAAAAGGAAAGAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAG<br>AAGCAGCTTTCGAAAGAAACCCGATCGACTTCTGTGAAAGCAAGGGA<br>TACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA<br>GCCGTTCGAACTGGAAACCGGAAGAAAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAA<br>GCCCGAAGACACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCGTGAAACAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAATTCAGCAAG<br>AGAGTCATCCTGGCAGACGCAACCTGGACAAAGTCTGAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAAACAT<br>CATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACAAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA<br>AGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAGCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 5】

|  |                                                                                                                                                                                                        |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGAT<br>CAATAGCCTTATTTCATCTCTTTTTCCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAA<br>CACCGTGTCATAAAAAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTT<br>TCTCTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 6】

|                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CMV由来の<br>5' UTR、配<br>列番号204に<br>対応するOR<br>F、K o z a k<br>配列、およびA<br>LBの3' UT<br>Rを有するC a<br>s 9 転写産物 | GGGCAGATCGCCCTGGAGACGCCATCCACGGCTGTTTGTGACCTCCATA<br>GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGGGCCGGGAACGGTGCAT<br>TGGAACGGGATTCGCCGTGCCAAGAGTGACTCACCGTCTCTTGACA<br>CGGCCACCATGGACAAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC<br>AAACAGCGTGGATGGGCAGTCTATCAGACGAAATACAAAGTCCCG<br>AGCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCA<br>AGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGC<br>AGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGAGATACACAAGA<br>AGAAAGAACAGAACTCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA<br>TGGCAAAAGGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTT<br>CCTGGTCGAAGAAGACAAAGAAAGCAAGCAAGAAAGACACCCGATCTTCGGA<br>AAATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAGTACCCGACAAATCT<br>ACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCT<br>GAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGA<br>CACTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAAACCCGGACACACAGGACGTGG<br>ACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAAGCTGTTTGA<br>AGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCCACGCAAAAGGCAATCCCTG<br>AGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCAC<br>AGCTCCCGGAGAAAAGAAAGAACCGGACTGTTCCGGAAAACCTGATCGC<br>ACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTG<br>GCAGAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACG<br>ACCTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAAGACCT<br>GTTCTGGCAGCAAAAGAAACCTGAGCGGACGCAATCCTGCTGAGCGAC | 257 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 8 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAA<br>GCATGATCAAGAGATACGACGAACACACCCAGGACCTGACACTGCT<br>GAAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGGAAAAGTACAAGGAAATC<br>TTCTTTCGACCCAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAG<br>GAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACAAATTCAATCAAGCCGATCCTTGA<br>AAAGATGGACGGAACAGAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAA<br>GACCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCCG<br>ACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGGCAATCCTGAGAAAGACAGGA<br>AGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAG<br>ATCCTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTGCGACCCGCTGGCAAGAG<br>GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAAT<br>CACACCGTGGAACTTCGAAGAAAGTCGTGACAAAGGGAGCAAGCGCA<br>CAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGA<br>ACGAAAAGGTCCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC<br>AGTCTACAAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAAGGAATG<br>AGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCG<br>ACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGTCAAGCAGCTGAA<br>GGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAAATC<br>AGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAAACATACCACG<br>ACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAG<br>AAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTC<br>GAAACAGAGAAATGATCGAAGAAAGAACTGAAGACATACGCACACCC<br>TGTTCCGACGACAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 20 - 88】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGAC<br>AAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGAGAT<br>TCGCAAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC<br>ATCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGCACAGGGAGAC<br>AGCCTGCACGAAACATCGCAACCTTGGCAGGAAGCCCGCAATCA<br>AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAA<br>GGTCAATGGGAAAGACACAGCCGGAACATCGTCAATCGAATGGCA<br>AGAGAAACCAGACAAACACAGAGGACAGAAAGACAGCAGAGAAA<br>GAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGAT<br>CCTGAAGGAACACCCGGTCGAAACACACAGCTGCAGAACGAAAG<br>CTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCGACC<br>AGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACAT<br>CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTC<br>CTGACAAAGAACCGACAAAGAACAGAGGAAAGAGCGACACGTCGCCA<br>GCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAATCTACTGGAGACAGCTGCT<br>GAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTGACAACTGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAATCTGGACAAAGGCAGGATTCATCA<br>AGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACA<br>GATCCTGGACACAGAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAG<br>CTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCA<br>GGGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAA<br>CAACTACCAACCGCACACGACGCAATACCTGAACGCACTCGTCGGA<br>ACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCT |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 8 9】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAG<br>CGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC<br>AACATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAG<br>AAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAACGAGGAGAAACAGGAGA<br>AATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTC<br>CTGAGCATGCCGACGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGA<br>CAGGAGGATTTCAGCAAGGAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGA<br>CAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGATACGGA<br>GGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAA<br>AGTCTGAAAGGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGGTCAAGGAACCT<br>GCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCG<br>ATCGACTTCTTGGAAAGCAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAAGGACC<br>TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCTGAACTGGAAAACGG<br>AAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAAC<br>GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTCTGTACCTGGCA<br>GCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAA<br>GCAGCTGTTCTGTCGAACAGCAACAGCACTACCTGGACGAAATCATC<br>GAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGAGATCATCTGGCAGACGCAA<br>ACCTGGACAAGGTCTGTAGCGCATACAAACAGCACAGAGACAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCAGAAACATCATCCACCTGTTCCACACTGACA<br>AACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAGTACTTCGACACAACAATCG<br>ACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCTGTGACGCAACACT<br>GATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTG |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AGCCAGCTGGGAGGAGACGGGAGGAGGAAAGCCGAAAGAAAGAGAA<br>AGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGA<br>GAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCACTCTTTT<br>TCCTTTTCGTTGGTGTAAAGCCCAACACCCCTGCTAAAAACATAAA<br>TTTCCTTTAATCATTTTGGCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTATATAA<br>AAATGGAAAGAACCTCGAG |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 91】

|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HBB由来の<br>5' UTR、配<br>列番号204に<br>対応するOR<br>F、Kozak<br>配列、およびH<br>BBの3' UT<br>Rを有するCa<br>s9転写産物 | 258<br>GGGacatttgccttcttgacacaaactgtgttcaactagcaacctcaaac<br>agacacccggatctlgccacccATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTG<br>GACATCGGAACAACAAGCGTTCGGATGGGCAGTCAACAGACGAAT<br>ACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGAAACACAGACAG<br>ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGTCTTGGACAGC<br>GGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAGAA<br>GATACACAAGAAGAAGAACAAGAAATCTGTCTACCTGCAGGAAATCTT<br>CAGCAACGAAATGGCAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG<br>GAAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAGAAGACAAGAACGACGAAAGACACC<br>CGATCTTCGGAAACATCTGTGGACGAAGTGGCATACCCAGAAAGTA<br>CCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGAC<br>AAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCAACATGATCA<br>AGTTCAGAGGACACTTCTGTATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAA<br>CAGCGACGTGGACAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAA<br>CAGCTGTTCGAAGAANAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCAAGGCA<br>AGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAA<br>CCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGANAAGANAAGAACGGACTGTTCGGA<br>AACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCA<br>ACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACAC<br>ATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCCAG<br>TAGGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAAGCTGAGCGACGCAATCC<br>TGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCAACAAAGGCACC<br>GCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAACACACAGGAC |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 2】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT<br>ACAAGGAAATCTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATA<br>CATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTCATCAAG<br>CCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGC<br>TGAAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAAACGG<br>AAGCATCCCGCACACAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTG<br>AGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGACACACAGAGAAA<br>AGATCGAAAAGATCCTTGACATTTCAGAAATCCCGTACTACGTCCGGACC<br>GCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAAGAGC<br>GAAGAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAA<br>GAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAA<br>GAACCTGCCGAAACGAANAAGTCCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTAC<br>GAATACTTCACAGTCTACAAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCA<br>CAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCCGGAGAACAGAGAA<br>GGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAGTCAAGTC<br>AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACA<br>GGTCGAATTCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGG<br>AACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTG<br>GACAAACGAAGAAAACGAAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACAC<br>TGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC<br>ATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGA<br>AGAAATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACG<br>GAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAA |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAGCGACGGATTTCGCCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC<br>GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCCACAGGTCAGCG<br>GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACTGGCAGGAAG<br>CCCCGCAATCAAGAAAGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTGTCGAC<br>GAACTGGTCAAAGGTCAATGGGAAGACACAGCCGGAACATCGTCA<br>TCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACAGAGGACAGAAAGAA<br>CAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAGAAATCAAGGAACCTG<br>GGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAACACACAGCTGC<br>AGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACTACCTGCCAGAACGGAAAGACAT<br>GTACGTCGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGAC<br>GTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCCTGAAGGACGACAGCATCG<br>ACAAACAAGGTCCCTGACAAGAAAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGA<br>CAACGTCCCGAGCGGAAGAAAGTCGTCAGAAAGATGAAGAACTACTGG<br>AGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACA<br>ACCTGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGC<br>AGGATTCAACAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAG<br>CACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACG<br>AAAACGACAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAG<br>CAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTC<br>AGAGAAATCAACAACCTACCAACCGCACACGACGCAATACCTGAAACG<br>CAGTCGTCCGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAG<br>CGAATTCTGTCACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATG<br>ATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAGTACT |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | TCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACT<br>GGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA<br>GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAG<br>TCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGAGGTCAACATCGTCAAGAAGAC<br>AGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGCAAGGAAGCATTCCTGCCGAG<br>AGAAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGA<br>AGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCT<br>GGTCGTCGCAAAAGTTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAGCTGAAGAGC<br>GTCAAGGAACGTCTGGGAATCACAAATCATGTGAAAGAACGCTTCG<br>AAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAGGATACAAAGGAAGT<br>CAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAA<br>CTGGAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGC<br>AGAAGGGAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCT<br>GTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGAC<br>AACGAACAGAAAGCAGCTGTTCGTGCAACAGCAACAGCACTACCTGG<br>ACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCT<br>GGCAGACGCNAACCTGGACAAAGTCTCTGAGCGCATACAAACAGCAC<br>AGAGACAAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAACATCATCCACCTGT<br>TCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTCGA<br>CACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCAACAAAGGAAGTCTG<br>GACGCAACACTGATCCACACAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAA<br>GAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACCGGAGGAGGAGCCCGAA<br>GAAGAAAGAGAAAGGTCTAGctagcgctcgcttctgtgctcaat |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | t t c t a t t a a a g t c c c t t g t t c c c t a a g t c c a a c t a c c t a a a c t g g<br>g g a t a t l a l g a a g g c c t l g a g c a t c l g g a t l c l g c c t a a l a a a<br>a a c a t t t a t t t c a t t g c c t c g a g |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 6】

|                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| XBG由来の<br>5' UTR、配<br>列番号204に<br>対応するOR<br>F、Kozak<br>配列、およびX<br>BGの3' UT<br>Rを有するCa<br>s 9 転写産物 | GGGaa g c t c a g a a t a a a c g c t c a a c t t t g g c c g g a t c t g c c a c c a T<br>GGACAAGAAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGACATCGGAACAAACAGCGTC<br>GGATGGGCAGTCAACACAGACGAAATACAAAGGTCCCGAGCAAGAAAGT<br>TCAAGGTCCCTGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCT<br>GATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACA<br>AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAACA<br>GAATCTGTCTACCTGCAGGAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGT<br>CGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAA<br>GAAGACAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCG<br>ACGAAGTCGCATACCAAGAAAGTACCCGACAAATCTACCACTGTAG<br>AAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATC<br>TACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGAGGACACTTCCTGA<br>TCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTT<br>CATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTTCGAAGAAACCCG<br>ATCAACGCAGCGGAGTCGACGCAGAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGAC<br>TGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG<br>AGAAAGAAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTG<br>GGACTGACACCCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGCG<br>CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAA<br>CCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCA<br>GCAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAG<br>TCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAA<br>GAGATACGACGAAACACCAACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTG | 259 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 9 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GTGAGACAGCAGCTGCCGGAAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACC<br>AGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCA<br>GGAAGAAATCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAGATGGAC<br>GGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA<br>GAAAGCAGAGAACATTCGACACACGGAAAGCATCCCGACCAAGATCCA<br>CCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAGACAGGAAGACTTCTAC<br>CCGTTCTGAAAGGACACAGAGAAAGATCGAAGATCCTGACAT<br>TCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAG<br>ATTGCCATGGATGACAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGG<br>AACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA<br>TCGAAAGAAATGACAAAATTCGACAAAGAACTGCCGAACGAAAGGT<br>CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACTTCACAGTCTACAAAC<br>GAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGG<br>CATTCCTGAGCGGAGAACACAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCACAGCAGCTGAAGGAAGACTAC<br>TTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG<br>AAGACAGATTCAACGCACAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAA<br>GATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGAC<br>ATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAG<br>AAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGA<br>CAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGAGATACACAGGATGGGGA<br>AGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCG<br>GAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAG |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 98】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AAACTTCATGCAAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAA<br>GACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACG<br>AACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGAAT<br>CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGA<br>AGACAAAGCCGGAAACATCGTCAATCGAAATGGCAAGAGAAACC<br>AGACAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAG<br>AATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA<br>CACCCGGTCGAAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAGCTGTACCTGT<br>ACTACCTGCAGAACGGAAAGAGACATGTACGTCCGACCCAGGAACCTGGA<br>CATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACATCGTCCCGCAG<br>AGCTTCCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTCCCTGACAAAGAA<br>GGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGT<br>CGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAG<br>CTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACTGACAAAGGCAGAGAGAG<br>GAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCT<br>GGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCCGACAGATCCTGGAC<br>AGCAGAAATGAAACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAG<br>AAGTCAAGGTCAACACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAG<br>AAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTCAAGAGTCAAGAGAAATCAACAACTACCCAC<br>CACGCACACGACCGCATACCTGAACCGCAGTCGTGGAACACAGCACTGA<br>TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGGAATTCGTCTACGGAGACTA<br>CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGGAACAGGAA<br>ATCGGAAAGGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 9 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACTTCTTCAAGACAGAAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAAA<br>GAGACCGCTGATCGAAACAAAACGGAGAAACAGGAGAAAATCGTCTGG<br>GACAAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAAGGTCTTGAGCATGC<br>CGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGATT<br>CAGCAAGGAAAGCATCTCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATC<br>GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACA<br>GCCCGACAGTCGCATTACAGCGTCTCTGGTCTCGCAAAAGGTCGAAA<br>GGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAATC<br>ACAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCC<br>TGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAA<br>GCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAAACGGAAAGAAAGAGA<br>ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCAC<br>TGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACTCTGGCAAGCCACTACGA<br>AAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAACAGAACAGCTGTTT<br>GTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCA<br>GGGAATTGAGCAAGAGAGTTCATCTCTGGCAGACGCAAACTGGACAA<br>GGTCCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGATCAGAGAA<br>CAGGCAGAAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAAACTGGGAG<br>CACCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGATCCACCAG<br>AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGG<br>GAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAAGAAAGAGAAAGGTCTAGct<br>agcaccagccctcaagaaacaccccgaaatggagctcttaagctacataa |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 0】

|                                                                                                            |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|                                                                                                            |  |
| taccacattacactttacaaaattgtgtcccccccaaaatgtagcccat<br>legtaletgctecctaaataaaaagaaagllctlcaaatlctlctgga<br>g |  |

10

20

30

40

50

【表 20 - 101】

|                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| CleanCap (商標) とともに使用するための最初の3個のヌクレオチドとしてのAGG、XBG山菜の5' UTR、配列番号204に対応するORF、Kozak配列、およびXBGの3' UTRを有するCars 9 転写産物 | AGGaa gctcagaaataaaacgctcaactttggccggatctgtccacCAT<br>GGACAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAACAAGCGTC<br>GGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGT<br>TCAAGTCCCTGGGAAACACAGACAGACAGCATCAAGAAGAACCT<br>GATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAGCAACA<br>AGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAACA<br>GAATCTGCTACCTGCAGGAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGT<br>CGACGACAGCTTCTTCACAGACTGGAGAAAGCTTCCTGGTCGAA<br>GAAGACAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGAAACATCGTCG<br>ACGAAGTCGCATACCACGAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAG<br>AAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGACAGCTGAGACTGATC<br>TACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGA<br>TCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGAGCTCGACAAGCTGTT<br>CATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAAGCTGTTCCGAAGAAACCCG<br>ATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCTGAGCGCAAGAC<br>TGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG<br>AGAAAGAGAACGGACTGTTCCGGAACCTGATCGCACTGAGCCTG<br>GGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACG<br>CAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAA<br>CCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTTCTGGCA<br>GCAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAG<br>TCACACAGAAATCAAAAGGCAACGCTGAGCGCAAGCATGATCAA<br>GAGATACGACGAACACCACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTG | 260 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 2】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| GTCAGACAGCAGCTGCCGGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACC<br>AGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCA<br>GGAAGAA TTCTACAAGTTCTATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGAC<br>GGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGA<br>GAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCATCCA<br>CCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTAC<br>CCGTTCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT<br>TCAGAAATCCCGTACTACTGCTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAG<br>ATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGGAAGAAACAATCACACCGTGG<br>AACTTCGAAAGTAGTCTGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCA<br>TCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAAAAGGT<br>CCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAAAC<br>GAAC TGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAGGAAATGAGAAAGCCGG<br>CATTCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGTCAAGGAGTGAAGGAAGACTAC<br>TTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCG<br>AAGACAGATTCAACGC AAGCCTGGGAACATACCAAGACCTGCTGAA<br>GATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGAC<br>ATCCTGGAAGACATCGTCTCTGACACTGACACTGTTCTGGAAGACAGAG<br>AAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCTGACGA<br>CAAGGT CATGAAGCAGCTGAAGAGAGAAAGATACACAGGATGGGGA<br>AGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGGAATCAGAGACAAAGCAGAGCG<br>GAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGACGGATTCCGCAAAACAG |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AAACTTCATGCGAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAAGGAA<br>GACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACG<br>AACACATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGGAAT<br>CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACCTGGTCAAGGTCATGGGA<br>AGACACAAGCCGGAANAACATCGTCAATCGAATGGAAGAGANAACC<br>AGACAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAG<br>AATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA<br>CACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGT<br>ACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACATGTACGTCGACCAAGGTCCTGACAAGAA<br>CATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGACCCACATCGTCCCGCAG<br>AGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAAGGTCCTGACAAGAA<br>GGGACAAGAACAGAGGAAGAAGCGGACAAACGTCCGAGCGAAGAAAGT<br>CGTCAAGAAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAAG<br>CTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAG<br>GAGGACTGAGCGAACCTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCT<br>GGTCGAAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGAC<br>AGCAGAAATGAACAACAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAG<br>AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAG<br>AAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACACTACCAC<br>CACGCACACGACCGCATACCTGAACGCGAGTCGTGGAACACAGCACTGA<br>TCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTA<br>CAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAAGGAA<br>ATCGGAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACTTCTTCAAGACAGAAAATCACACTGGCAACGGAGAAAATCAGAAA<br>GAGACCGCTGATCGAAACAACACGGAGAAACAGAGAAAATCGTCTGG<br>GACAAAGGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCCGTGAGCATGC<br>CGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGATT<br>CAGCAAGGAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATC<br>GCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACA<br>GCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGTCGTCGCAAAAGTCCGAAAA<br>GGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGCTGGGAATC<br>ACAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCC<br>TGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCAA<br>GCTGCCGAAAGTACAGCCCTGTTCCGAACTGGAAAACGGAGAAAAGAGA<br>ATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCAC<br>TGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGA<br>AAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGAAACAGAGCAGCTGTTC<br>GTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCA<br>GCGAAATTCAGCAAGAGAGTCAATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAG<br>GGTCCCTGAGCGCATACAAACAAGCAAGCAAGAGCAAGCCGATCAGAGAA<br>CAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAG<br>CACCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCCAG<br>AGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGG<br>GAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGGTCCTAGct<br>agcaccagccctcaagaacaccccgaaatggagtccttaagctacataa |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 0 5】

|  |                                                                                                                                                                                               |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | t a c c a a c t t a c a c t t t a c a a a a t g t t g t c c c c c a a a a t g t a g c c a t<br>l c g l a l c l g c l c c l a a l a a a a g a a a g l l l c l l c a c a l l c l c l c g a<br>g |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 6】

|                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C l e a n C a<br>p (商標) とと<br>もに使用するた<br>めの最初の3個<br>のヌクレオチド<br>としてのAG<br>G、HSD出来<br>の5' UTR、<br>配列番号204<br>に対応するOR<br>F、K o z a k<br>配列、およびA<br>LBの3' U T<br>Rを有するC a<br>s 9 転写産物 | 261<br>AGGTC CCGCAGTCCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACA<br>GCATCGGACTGGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAT<br>CACAGACGAATACAAGTCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGA<br>AACACAGACAGACACAGCATCAGAGAACCTGATCGGAGCAGCTGC<br>TGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAGACTGAAGAGAAC<br>AGCAAGAGAGATACACAGAGAGAAAGAACAGAACTGCTACCTG<br>CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAGGTCGACGACAGCTCT<br>TCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCTGGTCGAGAGACAAAGAACGA<br>CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAAGTCGCATAC<br>CACGAAAAGTACCCGACAACTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCG<br>ACAGCACAGACAGGACAGCCTGAGACTGATCTACCTGGCAGCTGGC<br>ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG<br>AACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCC<br>AGACATACAAACCAGCTGTTCCGAAAGAAACCCGATCAACGCAGCGG<br>AGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACG<br>GACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGAGACGCAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA<br>TCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAG<br>CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC<br>ACAAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAAC |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 20 - 107】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGGA<br>TAGGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACA<br>AGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACAA<br>TTCGACAAACGGAAGCATCCCCGACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGCATCTCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAAGGA<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTAC<br>TAGCTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA<br>CAAGAAAGAGCGAAGAAACAAATCACACCCGTGGAACTTCGAAGAAAGT<br>CGTCGACAAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGACA<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAACGAAAGGTCTCTGCCGAAGCACA<br>GCCGTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAAGGT<br>CAAGTACGTCAAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGA<br>GAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAA<br>AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGA<br>ATGCTTCGACAGCGTCGAANTCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAC<br>GCAAGCCTGGGAACATACCAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAACGAAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAGACAT<br>CGTCCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA<br>AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAAGGTCATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAAGACTGAGCAGAA<br>GCTGATCAACGGGAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAC TTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAAACAGAAACTTCAATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGC<br>ACAGGTCAGGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCAGACAAACACAGAAG<br>GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGAA<br>TCAAGGAAC TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAA<br>CACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAAC<br>GGAAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGA<br>GCGACTACGACGTCGACCCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTTGAAGGA<br>CGACAGCATCGACAAACAAAGGTCTGTGACAAAGAAAGCAAGAAACAGA<br>GGAAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAGTCTGTCAAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAAACGCAAAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGACTGAGCGAA<br>CTGGACAAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAAGAC<br>AGATCACAAAGCACGTCGCCACAGATCCTGGACACAGAAATGAACAC<br>AAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCAAGCACACGACGC<br>ATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTACAAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 0 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAACCGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGA<br>CTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATC<br>GTCAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCA<br>TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGA<br>CTGGGACCCGAAAGAAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCCCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAATCACAATCATGGAAAG<br>AAGCAGCTTCGAAAGAAACCCGATCGACTTCTCTGGAAAGCAAGGGA<br>TACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAGTACA<br>GCCTGTTCTGAACTGGAAACGGAAAGAAAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGGAACCGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGAA<br>GCCCCGAAAGACAAACGAAACAGAAAGCAGCTGTTCTGTCGAAACAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAG<br>AGAGTCATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCTCTGAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAA<br>AGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGTATCCACAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAGCCCCGAAAGAAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 0】

|                            |                                                                                                                                                                                                  |                  |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|                            | AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGAT<br>CAATAGCCTTATTCATCTCTTTTCTCTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAA<br>CACCCGTGCTAAAAACAATAATTTCTTTAATCATTTTGGCTCTTT<br>TCTCTGTGCTTCAATTATAAAAAATGGAAGAACCTCGAG | 2 6 2            |
| 3 0 / 3 0 / 3<br>9 ポリ A 配列 | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAA                                                                               | 2 6 3            |
| ポリ A 1 0 0 配<br>列          | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>A                                                                                                      | 2 6 4            |
| G 2 0 9 ガイド<br>RNA         | mC*mC*mA*GUCCAGCGGCAAGGGUUUUAGAGCUAGAAUAGC<br>AAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCACC<br>GAGUCGGUGCmU*mU*mU*U                                                                           | 2 6 5 ~ 2<br>6 7 |
|                            | 未使用                                                                                                                                                                                              |                  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 1】

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Neisseria meningitidis Cas9 のアミノ酸配列 | MAAFKPN SIN Y I L G L D I G I A S V G W A M V E I D E E N P I R L I D L G V R V F<br>E R A E V P K T G D S L A M A R R L A R S V R R L T R R R A H R L L R T R R L L K R E G V L<br>Q A A N F D E N G L I K S L P N T P W Q L R A A A L D R K L T P L E W S A V L L H L I K H R<br>G Y L S Q R K N E G E T A D K E L G A L L K G V A G N A H A L Q T G D F R T P A E L A L N K<br>F E K E S G H I R N Q R S D Y S I T F S R K D L Q A E L I L L F E K Q K E F G N P H V S G G<br>L K E G I E T L L M T Q R P A L S G D A V Q K M L G H C T F E P A E P K A A K N T Y T A E R<br>F I W L T K L N N L R I L E Q G S E R P L T D T E R A T L M D E P Y R K S K L T Y A Q A R K<br>L L G L E D T A F F K G L R Y G K D N A E A S T L M E M K A Y H A I S R A L E K E G L K D K<br>K S P L N L S P E L Q D E I G T A F S L F K T D E D I T G R L K D R I Q P E I L E A L L K H<br>I S F D K F V Q I S L K A L R R I V P L M E Q G K R Y D E A C A E I Y G D H Y G K K N T E E<br>K I Y L P P I P A D E I R N P V V L R A L S Q A R K V I N G V V R R Y G S P A R I H I E T A<br>R E V G K S F K D R K E I E K R Q E E N R K D R E K A A A K F R E Y F P N F V G E P K S K D<br>I L K L R L Y E Q Q H G K C L Y S G K E I N L G R L N E K G Y V E I D H A L P F S R T W D D<br>S F N N K V L V L G S E N Q N K G N Q T P Y E Y F N G K D N S R E W Q E F K A R V E T S R F<br>P R S K K Q R I L L Q K F D E D G F K E R N L N D T R Y V N R F L C Q F V A D R M R L T G K<br>G K K R V F A S N G Q I T N L L R G F W G L R K V R A E N D R H H A L D A V V A C S T V A<br>M Q Q K I T R F V R Y K E M N A F D G K T I D K E T G E V L H Q K T H F P Q P W E F F A Q E<br>V M I R V F G K P D G K P E F E A D T L E K L R T L L A E K L S S R P E A V H E Y V T P L<br>F V S R A P N R K M S G Q G H M E T V K S A K R L D E G V S V L R V P L T Q L K L K D L E K<br>M V N R E R E P K L Y E A L K A R L E A H K D D P A K A F A E P F Y K Y D K A G N R T Q Q V<br>K A V R V E Q V Q K T G V V R N H N G I A D N A T M V R V D V F E K G D K Y Y L V P I Y S<br>W Q V A K G I L P D R A V V Q G K D E E D W Q L I D D S F N F K F S L I P N D L V E V I T K | 268 |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 2】

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |       |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|                    | KARMFGYFASCHRG TGN I N I R I HDL D H K I G K N G I L E G I G V K T A L S F<br>Q K Y Q I D E L G K E I R P C R L K K R P P V R S G K R T A D G S E F E S P K K K K V E                                                                                                                                  | 2 6 9 |
|                    | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |       |
| G 5 0 2 ガイド<br>RNA | m A * m C * m A * C A A A U A C C A G U C C A G C G G U U U A G A m G m C m U m A m G m A<br>m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U<br>m U m G m A m A m A m A m G m U m G m C m A m C m G m A m G m U m C m G m G m U<br>m G m C m U * m U * m U | 2 7 0 |
|                    | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2 7 1 |
|                    | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 2 7 2 |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 1 3】

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| e GFP の DN<br>A コー ド 配 列 | 2 7 3<br>TCGCCGGTTTCGGGTGATGACGGTGAAACCTCTGTGACACATGCAGCT<br>CCCGAGACGGTCAACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGAGCAGA<br>CAAGCCCGTCAGGGCGGTACAGCGGTGTGTGGCGGTGTCCGGGCT<br>GGCTTAACTATCGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCA<br>TATGCGGTGTGAATAACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGC<br>ATCAGGGGCCATTTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC<br>GATCGGTGCGGGCCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG<br>ATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCACAG<br>TCACGACGTGTAAACGACGGCCAGTGAATTCTAATACGACTCAC<br>TATAGGGTCCCGCAGTCGGGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTG<br>TGTGTCGTTGCAGGCCCTATTTCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG<br>GAGCTGTTCAACGGGTGGTGGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG<br>ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGA<br>TGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCAATCTGCACCCAGGC<br>AAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGACCTACG<br>GCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAATGAAGCAGCACGA<br>CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAAGGCTACGTCCAGGAGGGCAC<br>ATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGA<br>AGTTCGAGGGCGACACCTGGTGTAACCGCATCGAGCTGAAGGGCAT<br>CGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCAACAGCTGGAGTAC<br>AACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGCAAGCAGAAGA<br>ACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCCAACATCGAGGACGG<br>CAGCGTGCAAGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAAACACCCCATCGGC |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAAACCACCTACCTGAGCACCCAGT<br>CCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAAGCGGATCACATGGTCCT<br>GCTGGAGTTGCTGACCGCGCGGGATCAGCTCTCGGCATGGACGAG<br>CTGTACAAGTAATAGGAATTATGCAGTCTAGCCATCACATTTAAAA<br>GCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAGAGAAAGAAAATGAAGATCAA<br>TAGCTTATTCACTCTCTTTTCTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAAACAC<br>CCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTTAATCATTTTGGCTCTTTTCT<br>CTGTGCTTCAATTAAATAAAAAATGGAAGAACCTCGAGAAAAAAA<br>AAAAAAAACAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA<br>AAAAAAAACAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA<br>TCTAGACTTAAGCTTGATGAGCTCTAGCTTGGCGTAAATCATGGTCA<br>TAGCTGTTTCCGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACACA<br>ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCTGGGGTGCCCTAATG<br>AGTGAGCTAACTCACATTAAATTGCGTTTGGCTCAGTGGCCGCTTC<br>CAGTCGGGAACCTGTGTCGCCAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAAC<br>GGCGGGGAGAGCGGTTTGGGTATTGGCGCTCTTCCGCTTCTC<br>GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGGCGCGAGCGGTA<br>TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGG<br>ATAACGCCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG<br>GAACCGTAAGAGCGCGGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGC<br>CCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC<br>GAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTCCCCCTGGAAG<br>CTCCCCTCGTGGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 5】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CTGTCCGGCCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCT<br>CAGGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTGTAGTCTGTTCCGCTCCAAAGCT<br>GGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCCTTA<br>TCCGGTAACATACTGTCCTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTAT<br>CGCCACTGGCAGCAGCCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA<br>TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGC<br>TACACTAGAAGAACACAGTATTGTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG<br>TTACCTTCGGAAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAAC<br>CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTCGCAAGCAGCAGATTACG<br>CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTTGATCTTTTCTACGG<br>GGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGT<br>CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAA<br>AAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTTGGT<br>CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT<br>CTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCGTGACTCCCGTCGTGTAG<br>ATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA<br>TGATACCGCGAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTTATCAGCAAT<br>AAACCAGCCAGCCGGAAAGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCCTGCAACT<br>TTATCCGGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAG<br>TAAGTAGTTTCGCCAGTTAAATAGTTTGGCCAAACGTTGTTGCCATTGC<br>TACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTC<br>AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGT<br>TGTGCAAAAAAGCGTTAGTCTCTCGGTCTCCGATCGTTGTCAG |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20-116】

[illegible]

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 7】

|                 |                                          |       |
|-----------------|------------------------------------------|-------|
| CMV-3<br>5' UTR | TGCATTGGAAACGGGATTCCCCGTGCCAAGTGACTCACCG | 2 7 7 |
| SV40 NLS        | PKKKRKV                                  | 2 7 8 |
| S               |                                          |       |
| 例示的なNLS<br>1    | LAAKRSRTT                                | 2 7 9 |
| 例示的なNLS<br>2    | QAAKRSRTT                                | 2 8 0 |
| 例示的なNLS<br>3    | PAPAKRERTT                               | 2 8 1 |
| 例示的なNLS<br>4    | QAAKRPRTT                                | 2 8 2 |
| 例示的なNLS<br>5    | RAAKRPRTT                                | 2 8 3 |
| 例示的なNLS<br>6    | AAAKRSWSMAA                              | 2 8 4 |
| 例示的なNLS<br>7    | AAAKRVWSMAF                              | 2 8 5 |
| 例示的なNLS<br>8    | AAAKRSWSMAF                              | 2 8 6 |
| 例示的なNLS<br>9    | AAAKRKYFAA                               | 2 8 7 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 1 8】

|                        |                                |       |
|------------------------|--------------------------------|-------|
| 例示的なNLS<br>1 0         | RAAKRKAFAA                     | 2 8 8 |
| 例示的なNLS<br>1 1         | RAAKRKYFAV                     | 2 8 9 |
| 代替SV40<br>NLS          | PKKKRRV                        | 2 9 0 |
| ヌクレオプラス<br>ミンNLS       | KRPAA TKKAGQAKKKK              | 2 9 1 |
| SV40 NLS<br>の例示的なコード配列 | CCGAAAGAAAGAGAAAGGTC           | 2 9 2 |
| NLS1の例示<br>的なコード配列     | CTGGCAGCAAAGAGAAAGCAGAACACA    | 2 9 3 |
| NLS2の例示<br>的なコード配列     | CAGGCAGCAAAGAGAAAGCAGAACACA    | 2 9 4 |
| NLS3の例示<br>的なコード配列     | CCGGCACCCGGCAAAGAGAGAAAGAACACA | 2 9 5 |

10

20

30

40

50

【表 20 - 119】

|                      |                                     |     |
|----------------------|-------------------------------------|-----|
| NLS 4 の例示<br>的なコード配列 | CAGGCAGCAAAAGAGACCGAGAACACA         | 296 |
| NLS 5 の例示<br>的なコード配列 | AGAGCAGCAAAAGAGACCGAGAACACA         | 297 |
| NLS 6 の例示<br>的なコード配列 | GCAGCAGCAAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCAGCA | 298 |
| NLS 7 の例示<br>的なコード配列 | GCAGCAGCAAAAGAGAGTCTGGAGCATGGCATTC  | 299 |
| NLS 8 の例示<br>的なコード配列 | GCAGCAGCAAAAGAGAAAGCTGGAGCATGGCATTC | 300 |
| NLS 9 の例示<br>的なコード配列 | GCAGCAGCAAAAGAGAAAGTACTTCGAGCA      | 301 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 0】

|                             |                                 |         |
|-----------------------------|---------------------------------|---------|
| NLS10の例<br>示的なコード配<br>列     | AGAGCAGC AAAGAGAAAGGCATTGGCAGCA | 302     |
| NLS11の例<br>示的なコード配<br>列     | AGAGCAGC AAAGAGAAAGTACTTGGCAGTC | 303     |
| 代替SV40<br>NLSの例示的<br>なコード配列 | CCGAAGAAAGAGAAAGAGTC            | 304     |
| 例示的なKoz<br>ak配列             | g e e g e e R e e A U G G       | 305     |
|                             | 未使用                             | 306-310 |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 2 1】

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 開始コドンおよび終止コドンを有する、表5の低Aコドンを使用したCas9 ORF | ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACTCCG<br>TGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAA<br>GTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGCACTCCATCAAGAAGAAC<br>CTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCA<br>CCGGCTGAAGCGGACCGCCGGCGGGTACACCGCGGGAAGAA<br>CCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAG<br>GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCTGTGG<br>AGGAGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGT<br>GGACGAGGTGGCTACCAACGAGAAGTACCCCACTACCACTG<br>CGAAGAAGCTGTGTGACTCCACCGACAAAGCCGACCTGGGCTGA<br>TCTACCTGGCCCTGGCCCAACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCT<br>GATCGAGGCGACCTGAACCCCGAACCTCGACGTGGACAAAGCTG<br>TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTCGAGGAGAAC<br>CCATCAACGCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCG<br>GCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC<br>GGCGAGAAGAAGAACGGCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCC<br>TGGGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGA<br>CGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGAC<br>AACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCTGG<br>CCGCCAAGAACCCTGTCGACGCCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCG<br>GGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCCCTGTCGCCCTCCATGATC<br>AAGCGGTACGACGAGACCAACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCC<br>TGGTGGGCGACGAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTCGA | 311 |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CCAGTCCAAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCC<br>CAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGG<br>ACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGAGGACCTGTCT<br>GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCATCCCCACCCAGATC<br>CACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCT<br>ACCCCTTCCCTGAAGGACAAACCGGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGAC<br>CTTCGGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCC<br>CGGTTGCGCTGGATGACCCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCT<br>GGAAC TTCAGGAGGTGGTGGACAAAGGGCGCTCCGCCCACTCCTT<br>CATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAAACGAGAAG<br>GTGCTGCCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACA<br>ACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCC<br>CGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTG<br>TTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACT<br>ACTTCAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGT<br>GGAGGACCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTG<br>AAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAGGAAACGAGG<br>ACATCCTGGAGGACATCGTGTCTGACCTGACCCCTGTTTCGAGGACCG<br>GGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTTCGAC<br>GACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGG<br>GCGGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGGCA TCCGGGACAAGCAGTC<br>CGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAAC<br>CGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AGGACATCCAGAAGGCCCCAGGTGTCCGGCCAGGGGACTCCCCTGCA<br>CGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGC<br>ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG<br>GCGGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGAGAA<br>CCAGACCACCCAAGANGGCCAGAAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAG<br>CGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGG<br>AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAACTGTACCT<br>GTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTG<br>GACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGACCAACATCGTGCCCC<br>AGTCCCTTCCCTGAAGGACGACTCCATCGACAAACAAGTGCTGACCCG<br>GTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGGAG<br>GTGGTGAAGAAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA<br>AGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACCTGACCAAGGCCGAGCG<br>GGCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAAGCGCGCTTCATCAAGCGGCAG<br>CTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAGATCCTGG<br>ACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCCG<br>GGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCGGACTC<br>CGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGGTGGGGGAGATCAACAACCTACC<br>ACCAAGCCCAAGACGCGCTACCTGAACGCGCGTGGTGCGCACCGCCCT<br>GATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGAC<br>TACAAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGG<br>AGATCGGGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAAACATCAT<br>GAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCCGG |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCCGAGACCGGGGAGATCGGTGT<br>GGACAAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCAT<br>GCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGC<br>TTCCTCAAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAAGCTGA<br>TCGCCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGA<br>CTCCCCACCGTGGCCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGGTGGAG<br>AAGGGCAAGTCCAAAGANGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCA<br>TCACCATCATGGAGCGGTCCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTT<br>CCTGGAGGCCAAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC<br>AAGCTGCCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGC<br>GGATGCTGGCCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGC<br>CCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCCTCCCACTAC<br>GAGAAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGT<br>TCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT<br>CTCCGAGTTCTCCAAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC<br>AAGGTGCTGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGG<br>AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCAACCCTGACCAACCTGGG<br>CGCCCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAG<br>CGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACC<br>AGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCT<br>GGCGGGCGACGGCGGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 5】

|                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 開始および終止<br>コドンを含む<br>る、表5の低A<br>／Uコドンを使<br>用したC a s 9<br>ORF | ATGGACAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCG<br>TGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAA<br>GTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAAC<br>CTGATCGGGCCCTGCTGTTCCAGACGGCGGAGACCGCCGAGGCCA<br>CCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGGCGGGTACACCGGGCGGAGAGAA<br>CCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAG<br>GTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGGTGG<br>AGGAGGACAAAGAACGACGAGCGGCCACCCATCTTCGGCAACATCGT<br>GGACGAGGTGGCTACCAAGAGAGTACCCACCATCTACCACTG<br>CGGAAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAGGCCGACCTGGGCTGA<br>TCTACCTGGCCCTGGCCCAACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCT<br>GATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAAGCGACGTGGACAAAGCTG<br>TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTGAGGAGAAC<br>CCATCAAGCCAGCGCGGTGGACGCCAAAGGCCATCTGAGCGCCCG<br>GCTGAGCAAGAGCGCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC<br>GGCGAGAAAGAAAGACGGCCCTGTTGGGCAACCTGATCGCCCTGAGCC<br>TGGGCTGACCCCACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGA<br>CGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGAC<br>AACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTG<br>CCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCTGCTGAGCGACATCTCTGG<br>GGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCTGAGCGCCAGCATGATC<br>AAGCGGTACGACGAGACCAACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCC<br>TGGTGGCGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTCGA | 312 |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 6】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCAGAGCAAGAAAGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGC<br>CAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAAGCCCATCTGGAGAAGATGG<br>ACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGAGGACCTGCT<br>GGGAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCATCCCCACCAAGATC<br>CACCTGGGCGAGCTGACGCCATCCTGCGGCGGACGAGGACTTCT<br>ACCCCTTCCTGAAGGACAAACGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGAC<br>CTCCGGATCCCCCTACTACGTGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACAGC<br>CGGTTGCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCT<br>GGAAC TTCAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTT<br>CATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAAAGAGAG<br>GTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACA<br>ACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCC<br>CGCCTTCCTGAGCGCGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTG<br>TTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACT<br>ACTTCAAGAAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGT<br>GGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAGACCTGCTG<br>AAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAGGAAACGAGG<br>ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCCCTGTTTCGAGGACCG<br>GGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTTCGAC<br>GACAAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGG<br>GCGGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGGCA TC GGGGACAAGCAGAG<br>CGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAAC<br>CGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGGACATCCAGAAGGCCCCAGGTGAGCGGGCCAGGGCGACAGCCTGCA<br>CGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCGCCCATCAAGAAGGC<br>ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG<br>GCCGCCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGCCCGGGAGAA<br>CCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAACAGCCGGGAGCGGATGAAG<br>CGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGG<br>AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCT<br>GTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTG<br>GACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCATCGTGCCCC<br>AGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCG<br>GAGCGACAAGAACCGGGCCAAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAG<br>GTGGTGAAGAAGATGAAGAACCTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA<br>AGCTGATCAACCAGCGGAAGTTGGACAACTGACCAAGGCCGAGCG<br>GGCGGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAG<br>CTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCGAGATCCTGG<br>ACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCG<br>GGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTC<br>CGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGCGGGAGATCAACAACCTACC<br>ACCACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCCGCCCT<br>GATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTACGGCGAC<br>TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGGACAGG<br>AGATCGGCAGGGCCACCGCCAAAGTACTTCTCTACAGCAACATCAT<br>GAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGGAGATCCGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 2 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGGAGACCGGGCGAGATCGGTGT<br>GGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCAT<br>GCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGGAGGTGCAGACCGGGCGGC<br>TTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGA<br>TCGCCCCGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGA<br>CAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAG<br>AAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCA<br>TCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCATCGACTT<br>CCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGTGAAAGAGGACCTGATCATC<br>AAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGC<br>GGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGC<br>CCTGCCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTAC<br>GAGAAAGCTGAAGGCGAGCCCGAGGACAAAGAGCAAGAGCAGCTGT<br>TCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT<br>CAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC<br>AAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGG<br>AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGG<br>CGCCCCCGCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAG<br>CGGTACACCCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACC<br>AGAGCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCT<br>GGGCGGCGACGGCGGCGGCGAGCCCCAAGAAGAACGGGAAGGTGTGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

10

20

30

40

50



【表 20 - 129】

|                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2つのC末端N<br>LS配列、なら<br>びに開始および<br>終止コドンを含む<br>する、表5の低<br>Aコドンを使用<br>したCas9<br>ORF | ATGGACAAGAGTACTCCATCGGCCCTGGACATCGGCACCAACTCCG<br>TGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGTGCCCTCCAAGAA<br>GTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAAC<br>CTGATCGGGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCGGAGCCA<br>CCGGCTGAAGCGGACCGCCCGCGGGGTACACCGGGGAGAA<br>CCGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAG<br>GTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTCGGTGG<br>AGGAGGACAAGAACGACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGT<br>GGACGAGGTGGCTACACGAGAGAGTACCCACCATCTACCACTG<br>CGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAAGCGGACCTGCGGCTGA<br>TCTACCTGGCCCTGGCCCAACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCT<br>GATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTG<br>TTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTCGAGGAGAAC<br>CCATCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCG<br>GCTGTCCAAAGTCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCC<br>GGCGAAGAAGAAGAACGGCCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCC<br>TGGGCCCTGACCCCCCACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGA<br>CGCCAAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGAC<br>AACCTGCTGGCCCAAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCCTGG<br>CCGCCAAGAACCTGTCCGAGCGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCG<br>GGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATC<br>AAGCGGTACGACGAGCACCAACGAGACCTGACCCCTGCTGAAGGCC<br>TGGTGGCGCAGCAGCTGCCCGAGAGTACAAGGAGATCTTCTTCCA | 313 |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 0】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCAGTCCAAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGCCCTCC<br>CAGGAGGAGTTCTACAAGTTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGG<br>ACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCT<br>GCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACCAGATC<br>CACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGGGCGGCAGGAGGACTTCT<br>ACCCCTTCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGAC<br>CTTCGGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCTTGCCCCGGGGCAACTCC<br>CGGTTCCGCTGGATGACCCGGAAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCT<br>GGAAC TTCAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCTCCGCCCAAGTCCTT<br>CATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAG<br>GTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTGTACA<br>ACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCC<br>CGCCTTCCCTGTCCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTG<br>TTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACT<br>ACTTCAAGAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGT<br>GGAGGACCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTG<br>AAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCTCGACACGAGGAGAACGAGG<br>ACATCCTGGAGGACATCGTGTGACCCCTGACCCCTGTCGAGGACCG<br>GGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTCGAC<br>GACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGCGCGGTACACCGGCTGGG<br>GCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC<br>CGGC AAGACCATCCTGGACTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAAG<br>CGGAAC TTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGG |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 131】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGACATCCAGAAAGGCCCCAGGTGTCCGGGCCAGGGCGACTCCCTGCA<br>CGAGCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGC<br>ATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG<br>GCCGCCACAAGCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAA<br>CCAGACCCACCCAGAAAGGCCCAAGAACCTCCCGGAGCGGATGANG<br>CGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGG<br>AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAGCTGTACCT<br>GTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTG<br>GACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACACACATCGTGCCCC<br>AGTCCTTCCTGAAAGGACGACTCCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCG<br>GTCCGACAAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGGAG<br>GTGGTGAAGAAGATGAAGAACCTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCA<br>AGCTGATCAACCAGCGGAAGTTCCGACAACTGACCAAGGCCGAGCG<br>GGCGGCCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCCGCTTCATCAAGCGGCAG<br>CTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAGATCCTGG<br>ACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCCG<br>GGAGGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGACTTC<br>CGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACC<br>ACCACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGCCACCCGCCCT<br>GATCAAGAAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCTGTACGGCGAC<br>TACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGG<br>AGATCGGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAAATCAT<br>GAACTTCTTCAAGACCGGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGGAGATCCGG |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGAGATCGTGT<br>GGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCAT<br>GCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGC<br>TTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACCTCCGACAAGCTGA<br>TCGCCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGA<br>CTCCCCACCGTGGCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAG<br>AAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCA<br>TCACCATCATGGAGCGGTCTCTCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTT<br>CCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC<br>AAGCTGCCCCAAGTACTCCTCTGTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAAGC<br>GGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGC<br>CCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTCTCTGTACCTGGCTCTCCACTAC<br>GAGAACTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAGCAGCTGT<br>TCGTGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGAT<br>CTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC<br>AAGGTGCTGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGG<br>AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCTGACCAACCTGGG<br>CGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAG<br>CGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCTGTATCCACC<br>AGTCCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAAGCT<br>GGCGGGCGACGGCTCCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAC<br>GGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACTCCGGCTGA |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 3】

|                  |  |
|------------------|--|
| 3 1 4 ~ 3<br>2 8 |  |
| 未使用              |  |
|                  |  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 4】

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 開始コドンおよび終止コドンを有する、表5の低Aコドンを使用したNme Cas9 OR F | ATGGCCGGCCCTTCAAGCCCCAACTCCATCAACTACATCATCCTGGGCCCTGG<br>ACATCGGCATCGCCTCCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGA<br>GGAGGAGAAACCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGCGGGTGTTT<br>GAGCGGCCGAGTGCCCAAGACCGGCGACTCCCTGGCCATGGCCC<br>GGCGGCTGGCCCCGGTCCGTGCGGGCGGTGACCCGGCGGGGCCCA<br>CCGGCTGCTGCGGACCCGGGGCGTGTGAAGCGGGAGGGCGTGTG<br>CAGGCCGCCAATTCGACGAGAACGGCCCTGATCAAGTCCCTGCCCA<br>ACACCCCTGGCAGCTGCGGGCGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGAC<br>CCCCCTGGAGTGCTCCGCCGTGCTGCTGCACTGATCAAGCACCGG<br>GGTACCCTGTCCAGCGGAAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAAG<br>AGCTGGGGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCGGCAACGCCACGCCCT<br>GCAGACCGGCGACTTCCGGACCCCGCCGAGCTGGCCCTGAACAAG<br>TTCGAGAAGGAGTCCGGCCACATCCGGAAACAGCGGTCCGACTACT<br>CCACACCTTCTCCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCT<br>GTTGAGAGAGCAGAGGAGTTGGGCAACCCCACTGTCGGCGGC<br>CTGAAGGAGGGCATCGAGACCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCC<br>TGTCGGCGGACGCCGTGCAGAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGA<br>GCCGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACTACACCCCGAGCGG<br>TTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGG<br>GCTCCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGATGGA<br>CGAGCCCTACCGGAAGTCCAAGCTGACCTACGCCACGCCCCGGAAG<br>CTGCTGGGCTGGAGGACACCGCCTTCTTCAAGGGCTGCGGTACG<br>GCAAGGACAAACCGCGAGGCCCTCCACCTGATGGAGATGAAGGCTA |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 5】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CCACGGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAG<br>AAGTCCCCCCTGAACCTGTCCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCA<br>CCGCCCTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACGGCCGGCT<br>GAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCAC<br>ATCTCCTTCGACAAAGTTGTTGTCAGATCTCCTGAAGGCCCTGCGGC<br>GGATCGTGCCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCCTG<br>CGCCGAGATCTACGGCGACCCACTACGGCAAGAAGAACCCGAGGAG<br>AAGATCTACCTGCCCCCATCCCGCCGACGAGATCCGGAAACCCCG<br>TGGTGCTGGGGCCCTGTCCCAGGCCCGGAAGTGATCAACGGCGGT<br>GGTGCGCGGTACGGCTCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCC<br>CGGGAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGC<br>GGCAGGAGAGAACCGGAAGGACCGGAGAACGGCCCGCCCAAGTT<br>CCGGGAGTACTTCCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAGTCCAAGGAC<br>ATCCTGAAGCTGGGCTGTACGAGCAGCAGCAGCAGTGCCTGT<br>ACTCCGGCAAGGAGATCAACCTGGGCCGGCTGACGAGAGGGGCTA<br>CGTGGAGATCGAACACGCCCCCTGCCCTTCTCCCGGACCTGGGACGAC<br>TCCTTCAACAAACAAGTGCTGGTGCTGGGCTCCGAGAACCAAGACA<br>AGGGCAACCAGACCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTC<br>CCGGGAGTGGCAGGAGTTCAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCC<br>CCCCGGTCCAAAGACAGCGGATCCTGCTGCAGAAAGTTCGACGAGG<br>ACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCG<br>GTTCCCTGTGCCAGTTCTGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGCCAAG<br>GGCAAGAAAGCGGGTGTTCGGCTCCAAACGGCCAGATCACCAACCTGC |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 6】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| TGCGGGGCTTCTGGGGCCCTGCGGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCG<br>GCACACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCCTGCTCCACCGTGCC<br>ATGACGAGAGATCACCCGGTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACG<br>CCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCA<br>CCAGAAGACCCACTTCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTGGCCCCAGGAG<br>GTGATGATCCGGGTGTTCCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCCG<br>AGGAGCCGACACCCCTGGAGAAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCGAGAA<br>GCTGTCTCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTG<br>TTCGTGTCCCGGGCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCCAGGGCCACA<br>TGGAGACCGTGAAAGTCCGCCAAGCGGCTGGACGAGGCGTGTCCGT<br>GCTGCGGGTGCCCTGACCCAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAG<br>ATGGTGAAACCGGAGCGGGAGCCCAAGCTGTACGAGGCCCTGAAGG<br>CCCGGCTGGAGGCCCAACAAGGACGACCCCGCCAAAGGCCCTCGCCGA<br>GCCCTTCTACAAGTACGACAAGGCCGGCAACCGGACCCAGCAGGTG<br>AAGGCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGCGTGTGGGTGC<br>GGAACCAACAACGGCATCGCCGACAACGCCACCATGGTGGGGGTGA<br>CGTGTTCGAGAAAGGCGACAAAGTACTACCTGGTGCCCATCTACTCC<br>TGGCAGGTGGCCAAAGGGCATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTGCAAG<br>GCAAGGACGAGGAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCCTTCAACTT<br>CAAGTCTCCCTGCACCCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCAACCAAG<br>AAGGCCCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCCTCCTGCCACCGGGGACCG<br>GCACATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAGATCGGCAN<br>GAACGGCATCCTGGAGGGCATCGGGGTGAAGACCGGCCCTGTCTTC |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 3 7】

|                                                                                                                                                |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|                                                                                                                                                |  |
| CAGAAGTACCAGATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCCTGCC<br>GGCTGAAGAAGCGGCCCCCGTGCGGTCCGGCAAGCGACCGCCGA<br>CGGCTCCGAGTTCGAGTCCCCCAAGAAGCGGAAGGTGGAGTGA |  |
|                                                                                                                                                |  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 8】

|                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 開始および終止<br>コドンを含む<br>る、表5の低A<br>/Uコドンを使<br>用したNme<br>Cas9 OR<br>F | ATGGCGGCGCTTCAAGCCCAACAGCATCAACTACATCCTGGGCGCTGG<br>ACATCGGCATCGCCAGCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGA<br>GGAGGAGAAACCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGGGGTGTTC<br>GAGCGGGCCGAGGTGCCAAGACCCGGCGACAGCCTGGCCATGGCCC<br>GCGGCTGGCCCGAGCGTGGCGGCTGACCCGGCGGGGCCCA<br>CCGGCTGCTGGGACCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGTG<br>CAGGCGGCCAATTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGAGCCTGCCCA<br>ACACCCCTGGCAGCTGGGGCGGCCCGCTGGACCGGAAGCTGAC<br>CCCCCTGGAGTGGAGCGCCGTGCTGCTGCACCTGATCAAGCACCGG<br>GGCTACCTGAGCCAGCGGAGAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAAAG<br>AGCTGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCGGCAACGCCACGCCCT<br>GCAGACCGGCGACTTCGGGACCCCGCGGAGCTGGCCCTGAACAAG<br>TTCGAGAAGGAGAGCGGCCACATCCGGAAACAGCGGAGCGACTACA<br>GCCACACCTTCAGCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCT<br>GTTCGAGAAAGCAGAGGAGTTCGGCAACCCCACTGAGCGGGCGGC<br>CTGAAGGAGGGCATCGAGACCTGCTGATGACCCAGCGGCCCGCCC<br>TGAGCGGCGACGCCGTGCAGAAAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGA<br>GCCCGCCGAGCCCAAGCCGCGCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGG<br>TTCATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGG<br>GCAGCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGATGGA<br>CGAGCCCTACCGGAAGAGCAAGCTGACCTACGCCCAAGGCCCGGAAG<br>CTGCTGGGCGCTGGAGGACACCGCCCTTCTTCAAGGGCGCTGCGGTACG<br>GCAAGGACAAACGCCGAGGCCAGCACCTGTGATGGAGATGAAGGCCTA |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

329

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 3 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CCACGCCATCAGCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAG<br>AAGAGCCCCCTGAACCTGAGCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCA<br>CGCCCTTCAGCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCT<br>GAAGGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCAC<br>ATCAGCTTCGACAAAGTTCGTGCAGATCAGCCTGAAGGCCCTGCGGC<br>GGATCGTGCCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCCTG<br>CGCGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAGAACACCGAGGAG<br>AAGATCTACCTGCCCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCG<br>TGGTGCTGCGGGCCCTGAGCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGT<br>GGTGCGCGGTACGGCAGCCCCCGCCCGGATCCACATCGAGACCGCC<br>CGGAGGTGGGCAAGAGCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGC<br>GGCAGGAGAGAACCGGAAGGACCGGAGAGAGGCCCGCCGCAAGTT<br>CCGGGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGCGGAGCCCAAGAGCAAGGAC<br>ATCCTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCCTGT<br>ACAGCGGC AAGGAGATCAACCTGGGCCGGCTGAACGAG AAGGCTA<br>CGTGGAGATCGACCCACGCCCTGCCCTTCAGCCGGACCTGGGACGAC<br>AGCTTCAACAAAC AAGTGTGCTGGTGTGGCAGCGAGAACCAACA<br>AGGGCAACCAGACCCCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAAACAG<br>CCGGGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGTGGAGACCAAGCCGGTTC<br>CCCCGGAGCAAG AAGCAGCGGATCCTGCTGCAG AAGTTCGACGAGG<br>ACGGCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCGGTACGTGAACCG<br>GTTCCCTGTGCCAGTTCTGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGC AAG<br>GGCAAG AAGCGGGTGTTCGGCCAGCAACGGCCAGATCAACCAACCTGC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | TGCGGGGCTTCTGGGGCCCTGCCGAAGGTGCGGGCCGGAGAACGACCG<br>GCCACGCCCTGGACGCCCGTGGTGGTGGCCCTGCAGCACCGTGGCC<br>ATGCAGCAGAAAGATCACCCGGTTTCGTGCGGTACAAAGAGATGAACG<br>CCTTCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGGCAGGTGCTGCA<br>CCAGAAGACCCACTTCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCCAGGAG<br>GTGATGATCCGGGTGTTCCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCC<br>AGGAGCCGACACCCCTGGAGAAAGCTGGGACCCCTGCTGGCCGAGAA<br>GCTGAGCAGCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCCCTG<br>TTCGTGAGCCGGGCCCCCAACGGGAAGATGAGCGGCCAGGGCCACA<br>TGGAGACCGTGAAGAGCGCCCAAGCGGCTGGACGAGGGCGTGAGCGT<br>GCTGGGGGTGCCCTGACCCAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAAG<br>ATGGTGAACCGGAGCGGGAGCCCAAGCTGTACGAGGCCCTGAAGG<br>CCCGGCTGGAGGCCCAAGGACGACCCCGCCAAAGGCCCTTCGCCGA<br>GCCCTTCTACAAGTACGACAAAGCCGGCAACCGGACCCAGCAGGTG<br>AAGGCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGGCGTGTGGGTGC<br>GGAACCAACAACGGCATCGCCGACAAACGCCACCATGGTGGGGTGGA<br>CGTGTTCGAGAAAGGGCGACAAGTACTACCTGGTGCCCATCTACAGC<br>TGGCAGGTGGCCAAAGGGCATCCTGCCCCGACCGGGCCGTGGTGCAGG<br>GCAAGGACGAGGAGGACTGGCAGCTGATCGACGACAGCTTCAACTT<br>CAAGTTCAGCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCCAG<br>AAGGCCCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCAGCTGCCACCGGGGCACCG<br>GCAACATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAGATCGGCAA<br>GAACGGCATCCTGGAGGGCATCGGGCGTGAAGACCGCCCTGAGCTTC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 1】

|  |                                                                                                                                                   |                  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|  | CAG AAGTACCAGATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCC<br>GGCTGAAGAAGCGGCCCCCGTGGGGAGCGGCAAGCGGACCGCCGA<br>CGGCAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAGAAGAGCGGAAGGTGGAGTGA | 3 3 0 ~ 3<br>4 5 |
|  | 未使用                                                                                                                                               |                  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 2】

|                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 表5の低Aコード<br>ンを使用したC<br>as9 ORF<br>(開始コードま<br>たは終止コドン<br>なし、融合タン<br>パク質コード配<br>列に含めるのに<br>好適である) | <p>GAC AAG AAG TACT CCA ATCG GGC CTGG ACA TC GG CAC CA ACTCC GTGG<br/>GCT GGG CCG TGAT CAC CGAC GAG TACA AGGTGCC CTCCA AGA AGTT<br/>CAAG GTGC TGGG CAA CAC CGAC CGG CACTCCA TC AAG AAG AAC CTG<br/>ATCG GCG CCG CTGCTG TTC GACTCC GCG GAG ACC GCG AGGCC ACCC<br/>GGCTGA AGCG GACCG CCG CCG GCG GGTACA CCG GCG GAAGA ACCG<br/>GATCTGCTACCTGC AGGAGATCTTCTCCA CGAGATGGCC AAGGTG<br/>GACGACTCCTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCC TGGTGGAGG<br/>AGGACAAG AAGCACGAGCGG CACCCATCTTCGGCAACATCGTGA<br/>CGAGGTGGCCTACCACGAG AAGTACCC CACCATCTACCACCTGCCG<br/>AAG AAGCTGGTGGACTCCACCGAC AAGGCCGACCTGCCGCTGATCT<br/>ACCTGGCCCTGGCC CACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCC TGAT<br/>CGAGGGCGACCTGA ACCCGGAC AACTCCGACGTGGAC AAGCTGTT<br/>ATCCAGCTGGTG CAGACCTACA ACCAGCTGTT CGAGGAGAACCCCA<br/>TCAACGCCCTCCGGGCTGGACGCC AAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCT<br/>GTCCAAGTCCCGGCGCTGGAGAACCTGATCGCC CAGCTGCCCGGC<br/>GAG AAG AAG AACCGGCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGG<br/>GCCTGACCC CCACTTCAAGTCC AACTTCGACCTGGCCGAGGACCG<br/>CAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAC<br/>CTGCTGGCC CAGATCGGCGGAC CAGTACGCCGACCTGTTCTCTGGCCG<br/>CCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGGGGGT<br/>GAACACCGAGATCACCAAGGCC CCGCTGTCCGCCCTCCATGATCAAG<br/>CGGTACGACGAGCACCA CCGAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGG<br/>TGGGGCAGCAGCTGCCCGAGAGATACAAGGAGATCTTCTTCGACCA</p> | 346 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| GTCCAAGAAAGGCTACGCCGGCTACATCGACGGGGGGCCCTCCCAG<br>GAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAAGCCCATCTGGAGAAGATGGACG<br>GCACCGAGGAGCTGCTGTTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG<br>GAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCATCCCCACCAAGATCCAC<br>CTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGCAGGAGACTTCTACC<br>CCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTT<br>CCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCTCGGCCCGGGCAACTCCCCGG<br>TTCCGCTGGATGACCCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGA<br>ACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGGCGCTCCGCCCAAGTCCCTTCAT<br>CGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG<br>CTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAACCGTGTACAACG<br>AGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCG<br>CTTCCCTGTCGGCGAGCAGAAAGAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT<br>AAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT<br>TCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGA<br>GGACCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAG<br>ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACA<br>TCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCCCTGTTTCGAGGACCGGGA<br>GATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTTCGACCGAC<br>AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGTACACCGGCTGGGGCC<br>GGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGG<br>CAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACC<br>AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 4】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGGACTCCCCTGCACGA<br>GCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGGCATC<br>CTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGTGATGGGCC<br>GGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACCA<br>GACCACCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGG<br>ATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGC<br>ACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTA<br>CTACCTGCAGAAAGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGAC<br>ATCAACCCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGT<br>CCTTCCCTGAAGGACGACTCCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGGTC<br>CGACAAGAAACCCGGGCAAGTCCGACAAACGTGCCCTCCGAGGAGGTG<br>GTGAAGAAGATGAAGAAGTACTGTGGCGGCAAGCTGCTGAACGCCAAGC<br>TGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGG<br>CGGCCGTGTCGGAGCTGGACAAAGCCGGCTTCATCAAGCGGCAAGCTG<br>GTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAAGTGGCCCAAGTCCCTGGACT<br>CCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCCGGGA<br>GGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCCGACTTCCGG<br>AAGGACTTCCAGTTCTACAAAGTGGCGGGAGATCAACAACATACCAAC<br>ACGCCCAAGACGCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACGCCCTGAT<br>CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC<br>AAGGTGTACGACGTGGGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGA<br>TCGGCAAGGCCACCCGCCAAGTACTCTTCTACTCCAAACATCATGAA<br>CTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGGCCAACGGCGGAGATCCGGGAAG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 4 5】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGG<br>ACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCAATGCC<br>CCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGGCTTC<br>TCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCGGACAAGCTGATCG<br>CCGGAAAGAGGACTGGGACCCCAAGAACTACGGCGGCTTCGACTC<br>CCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAG<br>GGCAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCA<br>CCATCATGGAGCGGTCCCTCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG<br>CTGCCCAAGTACTCCCTGTTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>TGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGCCCT<br>GCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAG<br>AAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAACGAGCAGAACAGCTGTTCTG<br>TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACCGAGATCATCGAGCAGATCTC<br>CGAGTTCTCCAAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAG<br>GTGCTGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGGACAAAGCCATCCGGGAGC<br>AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC<br>CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGG<br>TACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAAGT<br>CCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGG<br>CGCGGACGGCGGGCTCCCCCAAGAAGAACGGGAAGGTG |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 6】

|                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 表5の低A/U<br>コドンを使用し<br>たC a s 9 O<br>RF (開始コード<br>ンまたは終止コ<br>ドンなし、融合<br>タンパク質コー<br>ド配列に含める<br>のに好適であ<br>る) | GACAAAGAAAGTACAGCATCGGGCCTGGACATCGGGACCAACAGCGTGG<br>GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGTGCCCGAGCAAGAAGTT<br>CAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAAACCTG<br>ATCGGGCCCTGCTGTTTCGACAGCGCGGAGACCGCGAGGCCACCC<br>GGCTGAAGCGGACCGCCCGGGCGGTACACCGCGGGAAGAACC<br>GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTG<br>GACGACAGCTTCTTCCACCGCTGGAGGAGAGCTTCCCTGGTGAGG<br>AGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGA<br>CGAGGTGGCTACACAGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGG<br>AAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT<br>ACCTGGCCCTGGCCCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCCCTGAT<br>CGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGAGTGGACAAAGCTGTTC<br>ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCA<br>TCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCAAAGGCCATCCTGAGCGCCCCGCT<br>GAGCAAGAGCCGGCGGTGGAGAACCTGATCGCCCGAGCTGCCCGGC<br>GAGAAAGAAACGGCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGG<br>GCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGC<br>CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAAC<br>CTGCTGGCCCCAGATCGGGCACCACTACGCCGACCTGTTCCCTGGCCG<br>CCAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGT<br>GAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAG<br>CGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGG<br>TGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAGTACAAAGGAGATCTTCTTCGACCA | 3 4 7 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAGCAAGAAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGGGGGCCAGCCAG<br>GAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACG<br>GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG<br>GAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCATCCCCACACAGATCCAC<br>CTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGGCGCAGGAGGACTTCTACC<br>CCTTCCTGAAGGACAAACGGGAGAGATCGAGAAGATCCTGACCTT<br>CCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCTCGGCCGGGCAACAGCCGG<br>TTCGCCCTGGATGACCCGGAGAGCGGAGGAGACCATCACCCCTTGA<br>ACTTCGAGGAGGTGTTGGACAAAGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCAT<br>CGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG<br>CTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTACAACG<br>AGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCG<br>CTTCCTGAGCGCGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTT<br>AAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT<br>TCAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGA<br>GGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAG<br>ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACA<br>TCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCTGACCTGTTTCGAGGACCGGGA<br>GATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCCACCTGTTCCGACGAC<br>AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGGGTACACCGGCTGGGGCC<br>GGCTGAGCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAAGCAGAGCGG<br>CAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGG<br>AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 4 8】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACATCCAGAGGGCCAGGTGAGCGGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGA<br>GCACATCGCCAACTGGCCGGCAGCCCGCCCATCAAGAAGGGCATC<br>CTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGTGATGGGCC<br>GGACAAGCCCGAGAAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACCA<br>GACCACCAGAGGGCCAGAAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGG<br>ATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGC<br>ACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCCTGA<br>CTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGAC<br>ATCAACCCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGA<br>GCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTGCTGACCCGGAG<br>CGACAAGAACCCGGGCAAGAGCGACAAACGTGCCCAGCGAGGAGTG<br>GTGAAGAAGATGAAGAATACTAC TGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGC<br>TGATCACCCAGCGGAAGTTGACAACTGACCAAGGCCGAGCGGGG<br>CGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCCGCTTCATCAAGCGGCAGCTG<br>GTGGAGACCCGGCAGATCAACCAGCAAGTGGCCCAAGATCCTGGACA<br>GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGA<br>GGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCGGG<br>AAGGACTTCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAAC<br>ACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGAT<br>CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCTGTGTACGGCGACTAC<br>AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGGAGCAGGAGA<br>TCGGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTCTCTTCTACAGCAACATCATGAA<br>CTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCAAACGGCGAGATCCGGGAAG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 149】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CGGCCCCCTGATCGAGACCAACGGCGGAGACCGGGGAGATCGTGTGGG<br>ACAAAGGCGCGGACTTCGCCACCGTCGGGAAGTGCTGAGCATGCC<br>CCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTC<br>AGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCAGCAAGCTGATCG<br>CCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAG<br>CCCCAACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGCCAAAGGTGGAAGAAG<br>GGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCA<br>CCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG<br>CTGCCCCAAGTACAGCCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>TGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGCCCT<br>GCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAG<br>AAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTCG<br>TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAG<br>CGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAG<br>GTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGGACAAGCCCATCCGGGAGC<br>AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC<br>CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGG<br>TACACCAAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGA<br>GCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGG<br>CGGCGACGGCGGGCGGACGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTG |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 150】

|                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2つのC末端N<br>LS配列を有す<br>る、表5の低A<br>コドンを使用し<br>たCas9 O<br>RF (開始コード<br>または終止コ<br>ドンなし、融合<br>タンパク質コー<br>ド配列に含める<br>のに好適であ<br>る) | 348<br>GACAAAGAAAGTACTCCATCGGGCCCTGGACATCGGGACCAACTCCGTGG<br>GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTT<br>CAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAAGAACCTG<br>ATCGGGCCCTGCTGTTGACTCCGGCGGAGACCGCGGAGGCCACCC<br>GGCTGAAGCGGACCGCCCGGGCGGTACACCGGCGGAAGAACCG<br>GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAAGGTG<br>GACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTGTTGGAGG<br>AGGACAAGAAGCACGAGCGGCCACCCATCTTCGGCAACATCGTTGA<br>CGAGGTGGCCTACACGAGAGTAGTACCCACCATCTACCACTGCGG<br>AAGAAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT<br>ACCTGGCCCTGGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTTGAT<br>CGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAAGCTGTT<br>ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCA<br>TCAACGCCCTCCGGCGTGGACGCCCAAGGCCATCTCTGTCGCCCGGCT<br>GTCCAAGTCCCGGGCGCTGGAGAACCTGATCGCCCAAGCTGCCCGGC<br>GAGAAAGAAACGGCCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGG<br>GCCTGACCCCCCACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGC<br>CAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAAC<br>CTGCTGGCCCAAGATCGGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTCTCTGGCCG<br>CCAGAAAGCTGTCCGACGCCATCTCTGCTGTCCGACATCTCTGGGGT<br>GAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCCTCCATGATCAAG<br>CGGTACGACGAGGACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAGGCCCTGG<br>TGGGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCA |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 1】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GTCCAAGAAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGCCCTCCAG<br>GAGGAGTTCACAAAGTTTCATCAAGCCCATCTCTGGAGAAGATGGACG<br>GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG<br>GAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCTCCATCCCCACCAAGATCCAC<br>CTGGGGAGCTGACGCCATCCTGCGGGCGGACGGAGACTTCTATCC<br>CCTTCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTT<br>CCGGATCCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGCAACTCCCCG<br>TTCGCCCTGGATGACCCGGAAGTCGAGGAGACCATCACCCCTGGA<br>ACTTCGAGGAGGTGGTGACAAAGGGCGCTCCGCCAGTCCCTTCAT<br>CGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG<br>CTGCCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTACAAAG<br>AGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCCG<br>CTTCCCTGTCGGCGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT<br>AAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT<br>TCAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGA<br>GGACCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAG<br>ATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGAACAACGAGGAGAACGAGGACA<br>TCCTGGAGGACATCGTGCTGACCTGACCCCTGTTCGAGGACCGGGA<br>GATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTTCGACCGAC<br>AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGGTACACCGGCTGGGGCC<br>GGCTGTCCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGG<br>CAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACC<br>AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 2】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACATCCAGAAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGGACTCCCCTGCACGA<br>GCACATCGCCAAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAAGGCATC<br>CTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGTGATGGGCC<br>GGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACCA<br>GACCAACCAGAAAGGCCAGAAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGG<br>ATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGC<br>ACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTA<br>CTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAAGGAGCTGGAC<br>ATCAACCCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGT<br>CCTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAAACAAAGTGCTGACCCGGTC<br>CGACAAGAACCGGGCAAGTCCGACAACTGACCAAGGCCGAGGAGGTG<br>GTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGC<br>TGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACTGACCAAGGCCGAGCGGGG<br>CGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTG<br>GTGGAGACCCGGCAGATCAACCAAGCACTGGCCCAAGATCCTGGACT<br>CCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGA<br>GGTGAAGGTGATCAACCTGAAGTCCAAAGCTGGTGTCGACTTCCGG<br>AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCAAC<br>ACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAACGCCCTGAT<br>CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC<br>AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGA<br>TCGGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACTCCAAATCATGAA<br>CTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGGAG |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 5 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | CGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGG<br>ACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGGAAGTGCTGTCCATGCC<br>CCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGGCTTC<br>TCCAAGGAGTCCATCCTGCTCCCAAGCGGAACTCGACAAAGCTGATCG<br>CCGGAAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTC<br>CCCCACCGTGGCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAG<br>GGAAAGTCCAAAGAAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCA<br>CCATCATGGAGCGGTCCCTTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG<br>CTGCCCAAGTACTCCCTGTTCTGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>TGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGCCCT<br>GCCCTCCAAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCTCCCACTACGAG<br>AAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTTCG<br>TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTC<br>CGAGTCTCCAAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCGCAACCTGGACAAAG<br>GTGCTGTCCGCCCTACAACAAGCACCGGGACAAAGCCCATCCGGGAGC<br>AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCTGACCAACCTGGGCGC<br>CCCCGCCGCCCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGG<br>TACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCTGATCCACCAAGT<br>CCATCACCGGCCCTGTACGAGACCCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGG<br>CGGCGACGGCTCCGGCTCCCCCAAGAAAGGGAAGGTGGACCGGC<br>TCCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGACTCCGGC |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 4】

|             |  |
|-------------|--|
| 3 4 9 ~ 3 5 |  |
| 未使用         |  |
|             |  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 5】

|                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>2つのC末端N<br/>LS配列を有す<br/>る、表4の低A<br/>／Uコドンを使<br/>用したCas9<br/>ORF（開始コ<br/>ドンまたは終止<br/>コドンなし、融<br/>合タンパク質コ<br/>ード配列に含め<br/>るのに好適であ<br/>る）</p> | <p>GACAAAGAAAGTACAGCATCGGGCCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG<br/>GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTT<br/>CAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAAGAACCTG<br/>ATCGGGGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGGGAGACCGCGGAGCCACCC<br/>GGCTGAAGCGGACCGCCCGGGCGGTACACCGGCGGAAGAACCG<br/>GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGTG<br/>GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCGTGGAGG<br/>AGGACAAAGAACACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGA<br/>CGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACTGCCG<br/>AAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCTGGGCTGATCT<br/>ACCTGGGCCCTGGCCCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCCTGAT<br/>CGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGTGGACAAAGCTGTT<br/>ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAAACCAGCTGTTCCGAGGAGAACCCCA<br/>TCAACGCCAGCGCGGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCT<br/>GAGCAAGAGCGCGGGCTGGAGAACCTGATCGCCACAGCTGCCCGGC<br/>GAGAAAGAAACGGCCCTGTTGGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCCTGG<br/>GCCTGACCCCACTTCAAGAGCACTTCGACCTGGCCGAGGACGC<br/>CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAA<br/>CTGCTGGCCAGATCGGGCACCCAGTACGCCGACCTGTTCTCGCCG<br/>CCAGAAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGT<br/>GAACACCGAGATCACCAAGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAG<br/>CGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGG<br/>TGGGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCA</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 6】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAGCAAGAAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGGCCAGCCAG<br>GAGGAGTTCTACAAGTTCAATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACG<br>GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG<br>GAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCATCCCCACCCAGATCCAC<br>CTGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGCGGCAGGAGGACTTCTACC<br>CCTTCCTGAAGGACAAACGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTT<br>CCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCTTGCCCGGGCAACAGCCGG<br>TTCGCCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGA<br>ACTTCGAGGAGGTGTGTGACAAAGGCCGCCAGGCCAGAGCTTCAT<br>CGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG<br>CTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTACAAACG<br>AGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGC<br>CTTCCTGAGCGGGAGCAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTTC<br>AAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT<br>TCAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGA<br>GGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACTACCACGACCTGCTGAAG<br>ATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACA<br>TCCTGGAGGACATCGTGTCTGACCTGACCTGACCTGTTCTGAGGACCGGGA<br>GATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTCTGACGAC<br>AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGGGTACACCGGCTGGGGCC<br>GGCTGAGCCGGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAAGCAGAGCGG<br>CAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACC<br>AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACATCCAGAAAGGCCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCCGACAGCCCTGCACGA<br>GCACATCGCCAAACCTGGCCGGCAGCCCGCCCATCAAGAAAGGCGATC<br>CTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGTGATGGGCC<br>GGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACCA<br>GACCACCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGG<br>ATCGAGGAGGCCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGC<br>ACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTA<br>CTACCTGCAGAAAGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGAC<br>ATCAACCCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGA<br>GCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACACACAAAGTGCTGACCCGGAG<br>CGACAAGAAACCCGGGCAAGAGCGACAAACGTGCCCAGCGAGGAGGTG<br>GTGAAGAAGATGAAGAATCTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGC<br>TGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACTGACCAAGGCCGAGCGGGG<br>CGCCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTG<br>GTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCCAGATCCTGGACA<br>GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCCGGGA<br>GGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGG<br>AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGGAGATCAACAACCTACCAAC<br>ACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGACCGCCCTGAT<br>CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTAC<br>AAGGTGTACGACGTGGGGAAGATGATCGCCAAAGCGGAGCAGGAGA<br>TCGGCAAGGCCACCGCCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAA<br>CTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGGAG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 5 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGCGGAGATCGTGTTGGG<br>ACAAAGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCC<br>CCAGGTGAACATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGCTTC<br>AGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCG<br>CCGGAAAGAAAGGACTGGGACCCCAAGAAAGTACGGCGGCTTCGACAG<br>CCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGCCCAAGGTGGAGAAG<br>GGCAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCA<br>CCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAACCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAAGACCTGATCATCAAG<br>CTGCCCAAGTACAGCCCTGTTCCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>TGCTGGCCAGCGCGCGGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGCCCT<br>GCCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAG<br>AAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAAAGAGCAGAAAGCAGCTGTTCG<br>TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAG<br>CGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAG<br>GTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGC<br>AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGC<br>CCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCAACCATCGACCGGAAGCGG<br>TACACCAAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGA<br>GCATCACCGGCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGG<br>CGGCGACGGCAGCGGCAGCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGACGGC<br>AGCCCCAAGAAAGCGGAAGGTGGACAGCGGC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

10

20

30

40

50

【表 20 - 159】

|                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 表4の低A/U<br>コドンを使用し<br>たCas9 O<br>RF (NLSな<br>し、および開始<br>コドンまたは終<br>止コドンなし、<br>融合タンパク質<br>コード配列に含<br>めるのに好適で<br>ある) | GACAAGAAAGTACAGCATCGGCCCTGGACATCGGGACCAACAGCGTGG<br>GCTGGGCCCGTGATCACCGACGAGTACAAAGGTGCCACCAAGAAAGTT<br>CAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGACAGCATCAAGAAAGAAACCTG<br>ATCGGCCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCGGAGGCCACCC<br>GGCTGAAGCGGACCGCCCGGGCGGTACACCGCGGGAAGAAACCG<br>GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAAGGTG<br>GACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCGTGGAGG<br>AGGACAAAGAAAGCACGAGCGGCCACCCATCTTCGGCAACATCGTGA<br>CGAGGTGGCCTACCACGAGAAAGTACCCACCATCTACCACCTGCCG<br>AAGAAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT<br>ACCTGGCCCTGGCCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCCTGAT<br>CGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAACAGCGACGTGGACAAAGCTGTT<br>ATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAAGCTGTTTCGAGGAGAAACCCA<br>TCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCT<br>GAGCAAGAGCCCGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCCAGCTGCCCGGC<br>GAGAAAGAAACGGCCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGG<br>GCCTGACCCCCAACTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGC<br>CAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAAC<br>CTGCTGGCCCAAGATCGGCCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCCTGGCCG<br>CCAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGGACATCCTGCGGGT<br>GAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAG<br>CGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCCTGCTGAAGGCCCTGG<br>TGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCA | 356 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAGCAAGAAAGGCTACGCCGGCTACATCGACGGGGGGCCAGCCAG<br>GAGGAGTTCTACAAGTTCAACAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACG<br>GCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCG<br>GAAGCAGCGGACCTTCGACAAACGGCAGCATCCCCACCAAGATCCAC<br>CTGGCGGAGCTGCAAGCCATCCTGCGGGGCGAGGAGACTTCTTACC<br>CCTTCCCTGAAGGACAAACGGGAGAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTT<br>CCGGATCCCCCTACTACGTGGCCCCCTTGGCCCCGGGCAACAGCCGG<br>TTCCGCTGGATGACCCGGAAGAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGA<br>ACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCAT<br>CGAGCGGATGACCAACTTCGACAAAGAACCTGCCCCAACGAGAAGTG<br>CTGCCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGGTGTACAACG<br>AGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGC<br>CTTCCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTC<br>AAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT<br>TCANGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGA<br>GGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAG<br>ATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAGGAGAACGAGGACA<br>TCCTGGAGGACATCGTGTGCTGACCTGACCCCTGTTGAGGACCGGGA<br>GATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACTGTTCCGACCGAC<br>AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGCGGTACACCGGCTGGGGCC<br>GGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGG<br>CAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACC<br>AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 6 1】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACATCCAGAAAGGCCCAGGTTGAGCGGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGA<br>GCACATCGCCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCCATCAAGAAGGGCATC<br>CTGCAGACCGTGAAAGGTGGTGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCC<br>GGCACAAAGCCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAACCA<br>GACCACCCAGAAAGGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGG<br>ATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGC<br>ACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAAGCTGTACCTGTA<br>CTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACACAGGAGCTGGAC<br>ATCAACCCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCAACATCGTGCCCCAGA<br>GCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAAGGTGCTGACCCGGAG<br>CGACAAGAAACCCGGGCAAGAGCGACAAACGTGCCCAGCGAGGAGGTG<br>GTGAAGAAGATGAAGAAGTCTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGC<br>TGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGG<br>CGGCCGTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTG<br>GTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCAAGTGGCCCAAGATCCTGGACA<br>GCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAAGCTGATCCGGGA<br>GGTGAAGGTGATCACCCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGG<br>AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACC<br>ACGCCACGACGCCCTACCTGAACGCCCGTGGTGGGCACCGCCCTGAT<br>CAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTTCGTGTACGGCGACTAC<br>AAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAAGAGCGGAGCAGGAGA<br>TCGGCAAGGCCACCGCCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAA<br>CTTCTTCAAGACCGAGATCACCCCTGGCCCAACGGCGAGATCCGGGAAG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
|  | CGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGATCGTGTTGGG<br>ACAAGGGCCGGACTTCGCCACCGTCCGGAAGTGCTGAGCATGCC<br>CCAGGTGAACAATCGTGAAGAAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGCTTC<br>AGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCG<br>CCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAG<br>CCCCACCGTGGCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAGAAG<br>GGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCA<br>CCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAAGAACCCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG<br>CTGCCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGA<br>TGCTGGCCAGCCGGCGAGCTGCAGAAAGGCAACGAGCTGGCCCT<br>GCCAGCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAG<br>AAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAAGCAGCTGTTGG<br>TGGAGCAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAG<br>CGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAAG<br>GTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGGACAAGCCCATCCGGGAGC<br>AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCTGACCCAACTGGGCGC<br>CCCCGCCGCCCTCAAGTACTTCGACACCCACCATCGACCGGAAGCGG<br>TACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCCTGATCCACCAGA<br>GCATCACCCGCCCTGTACGAGACCCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGG<br>CGGGGAC | 3 5 7 ~ 3<br>6 2 |
|  | 未使用                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 3】

|                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 表5の低Aコード<br>ンを使用したN<br>me Cas9<br>ORF (開始コ<br>ドンまたは終止<br>コードなし、融<br>合タンパク質コ<br>ード配列に含め<br>るのに好適であ<br>る) | G C G G C C T T C A A G C C C A A C T C C A T C A A C T A C A T C C T G G G C C T G G A C A<br>T C G G C A T C G C C T C C G T G G G C T G G G C C A T G G T G G A G A T C G A C G A G G A<br>G G A G A A C C C A T C G G G C T G A T C G A C C T G G G C G T G C G G G T G T T C G A G<br>C G G C C G A G T G C C C A A G A C C G G G A C T C C C T G G C C A T G G C C C G G C<br>G G C T G G C C C G G T C C G T G C G G C G G C T G A C C C G G G G G C C C A C C G<br>G C T G C T G C G G A C C C G G C G G C T G C T G A A G C G G A G G G C T G C T G C A G<br>G C C G C C A A C T T C G A C G A G A C G G C C T G A T C A A G T C C C T G C C C A A C A<br>C C C C T G G C A G C T G C G G G C C G C C C C T G G A C C G G A A G C T G A C C C C<br>C C T G G A G T G T C C G C C G T G C T G C T G C A C C T G A T C A A G C A C C G G G C<br>T A C C T G T C C C A G C G G A A G A C G A G G G C G A C C C C G A C A A G G A G C<br>T G G G C C C C T G C T G A A G G G C G T G G C C G G C A A C G C C C A C G C C C T G C A<br>G A C C G G C G A C T T C C G G A C C C C G C C G A G C T G G C C C T G A A C A A G T T C<br>G A G A A G G A G T C C G G C C A C A T C C G G A A C C A G C G G T C C G A C T A C C C<br>A C A C C T T C T C C C G G A A G G A C C T G C A G C C G A G C T G A T C C T G C T G T T<br>C G A G A A G C A G A A G G A G T T C G G C A A C C C C A C G T G T C C G G C G C C T G<br>A A G G A G G C A T C G A G A C C C T G C T G A T G A C C C A G C G G C C C G C C C T G T<br>C G G C G A C G C C G T G C A G A A G A T G C T G G G C C A C T G C A C C T T C G A G C C<br>C G C G A G C C C A A G G C C G C C A A G A A C A C C T A C A C C G C C G A G C G G T T C<br>A T C T G G C T G A C C A A G C T G A A C A A C C T G C G G A T C C C T G G A C A G G C T<br>C C G A G C G G C C C C T G A C C G A C A C C G A G G G G C C A C C C T G A T G G A C G A<br>G C C C T A C C G G A A G T C C A A G C T G A C C T A C G C C C A G G C C C G G A A G C T G<br>C T G G G C C T G G A G G A C A C C G C C T T C T T C A A G G G C C T G C G G T A C G G C A<br>A G G A C A A C G C C G A G G C C T C C A C C C T G A T G G A G A T G A A G G C C T A C C A |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CGCCATCTCCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAAGAAG<br>TCCCCCTGAACCTGTCCCCGAGCTGCCAGACGAGATCGGCACCG<br>CCTTCTCCCTGTTCAAGACCGACGAGGACATCACCGGCCGGCTGAA<br>GGACCGGATCCAGCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATC<br>TCCTTCGACAAAGTTCGTGCAGATCTCCCTGAAGCCCTGCGGCGGA<br>TCGTGCCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCCTGCCG<br>CGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAAGAACACCGAGGAGAAAG<br>ATCTACCTGCCCCCATCCCCGCCGACGAGATCCGGAAACCCCGTGG<br>TGCTGGGGCCCTGTCCCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGTGGT<br>GCGGCGGTACGGCTCCCCCGCCCCGATCCACATCGAGACCGCCCCG<br>GAGGTGGGCAAGTCCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGC<br>AGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAAGCCGCCCAAGTCCCG<br>GGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGGCGAGCCCAAAGTCCAAGGACATC<br>CTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCACGGCAAGTGCCCTGTACT<br>CCGGCAAGGAGATCAACCTGGGCCGGCTGAACGAGAAAGGCTACGT<br>GGAGATCGACCAACGCCCTGCCCTTCTCCGGACCTGGGACGACTCC<br>TTCAAACAACAAAGGTGCTGTGCTGGGCTCCGAGAACCAAGAACAGG<br>GCAACCAAGACCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACTCCCG<br>GGAGTGGCAGGAGTTCAAGGCCCGGGTGGAGACCTCCCGGTTCCCC<br>CGGTCCAAGAAAGCAGCGGATCCTGCTGCAGAAAGTTCGACGAGGACG<br>GCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCCGGTT<br>CCTGTGCCAGTTCGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGCAAGGGC<br>AAGAAAGCGGGTGTTCGCCCTCCAAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GGGGCTTCTGGGGCTGCGGAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCA<br>CCAGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCTGCTCCACCGTGGCCATG<br>CAGCAGAAAGATCACCCGGTTTCGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCT<br>TCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCACCA<br>GAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCCAGGAGTG<br>ATGATCCGGGTGTTGCGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGG<br>AGCCGACACCCCTGGAGAAAGCTGCGGACCCCTGCTGGCCGAGAAAGCT<br>GTCTCCCGGCCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCTGTTC<br>GTGTCCCGGCCCCCAACCGGAAGATGTCCGGCCAGGCCACATGG<br>AGACCGTGAAAGTCCGCCAAGCGGCTGGACGAGGCGTGTCCGTGCT<br>GGGGTGCCCCTGACCCAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAGAAGATG<br>GTGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCC<br>GGCTGGAGGCCCAAGGACGACCCCGCCAAAGCCCTTCGCCGAGCC<br>CTTCTACAAAGTACGACAAGGCCCGGCAACCGGACCCAGCGTGAAG<br>GCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGCGTGTGGGTGCGGA<br>ACCACAACGGCATCGCCGACAACGCCACCATGGTGGGGTGGACGT<br>GTTGAGAAAGGCGACAAAGTACTACCTGGTGCCCATCTACTCCTGG<br>CAGGTGGCCAAAGGCCATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTGCAAGGCA<br>AGGACGAGGAGACTGGCAGCTGATCGACGACTCCTTCAACTTCAA<br>GTTCTCCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAGAAG<br>GCCGGGATGTTCCGGCTACTTCGCCCTCCTGCCACCGGGCACCGGCA<br>ACATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCAACAAGATCGGCAGA<br>CGGCATCCTGGAGGGCATCGGCGTGAAGACCGCCCTGTCTCCAG |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 6】

|  |                                                                                                                                          |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AAGTACCAGATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGC<br>TGAAGAAGCGGCCCCCGTGCGGTCCGGCAAGCGGACCGCCGACGG<br>CTCCGAGTTCGAGTCCCCCAAGAAGCGGAAGGTGGAG |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 167】

|                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 表5の低A/U<br>コドンを使用し<br>たNme Ca<br>s9 ORF<br>(開始コドン主<br>たは終止コドン<br>なし、融合タン<br>パク質コード配<br>列に含めるのに<br>好適である) | GCCGCCCTTCAAGCCCCAACAGCATCAACTACATCCTGGGCCCTGGACA<br>TCGGCATCGCCAGCGTGGGCTGGGCCATGGTGGAGATCGACGAGGA<br>GGAGAACCCCATCCGGCTGATCGACCTGGGCGTGGGGTGTTCGAG<br>CGGGCCGAGGTGCCCAAGACCGGCGACAGCCTGGCCATGGCCCCGGC<br>GGCTGGCCCCGAGCGTGGGGGGCTGACCCGGGGGGGCCACCG<br>GCTGCTGCGGACCCGGCGGCTGCTGAAGCGGGAGGGCGTGTGTCAG<br>GCGGCCA ACTTCGACGAGAACGGCCTGATCAAGAGCCTGCCCAACA<br>CCCCCCTGGCAGCTGCGGGCCGCCCTGGACCGGAAGCTGACCCC<br>CCTGGAGTGGAGCGCGTGTCTGTCACTGATCAAGCACCGGGGC<br>TACCTGAGCCAGCGGAGAACGAGGGCGAGACCGCCGACAGGAGC<br>TGGGCGCCCTGCTGAAGGGCGTGGCCGGCAACGCCACGCCCTGCA<br>GACCGCGACTTCCGGACCCCGCGAGCTGGCCCTGAAACAAGTTC<br>GAGAAAGGAGAGCGGCCACATCCGGAACCAAGCGGAGCGACTACAGCC<br>ACACCTTCAGCCGGAAGGACCTGCAGGCCGAGCTGATCCTGCTGTT<br>CGAGAGCAGAGGAGTTCGGCAACCCCCACGTCGAGCGGGGCCCTG<br>AAGGAGGGCATCGAGACCTGCTGTGATGACCCAGCGGCCCGCCCTGA<br>GCGGCGACGCCGTGCAGAGATGCTGGGCCACTGCACCTTCGAGCC<br>CGCCGAGCCCAAGGCCGCCAAGAACACCTACACCGCCGAGCGGTTTC<br>ATCTGGCTGACCAAGCTGAACAACCTGCGGATCCTGGAGCAGGGCA<br>GCGAGCGGCCCTGACCGACACCGAGCGGGCCACCTGATGGACGA<br>GCCCTACCGGAAGAGCAAGCTGACCTACGCCACGCGCCGGAAGCTG<br>CTGGGCCCTGGAGGACACCGCCCTCTTCAAGGGCCTGCGGTACGGCA<br>AGGACAAAGCCGAGGCCAGCACCTGTGATGGAGATGAAGGCCCTACCA | 364 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 6 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CGCCATCAGCCGGGCCCTGGAGAAGGAGGGCCCTGAAGGACAAGAAG<br>AGCCCCCTGAACCTGAGCCCCGAGCTGCAGGACGAGATCGGCACCG<br>CCTTCAGCCCTGTTCAAGACCGAGGAGACATCACCGGCCGGCTGAA<br>GGACCGGATCCAGCCCCGAGATCCTGGAGGCCCTGCTGAAGCACATC<br>AGCTTCGACAAAGTTGTTGTCAGATCAGCCTGAAGGCCCTGCGGCGGA<br>TCGTGCCCCCTGATGGAGCAGGGCAAGCGGTACGACGAGGCCCTGCGC<br>CGAGATCTACGGCGACCACTACGGCAAGAAAGAACACCGAGGAGAAAG<br>ATCTACCTGCCCCCATCCCCCGCCGACGAGATCCGGAACCCCGTGG<br>TGCTCGGGCCCTGAGCCAGGCCCGGAAGGTGATCAACGGCGGTGGT<br>GGGGCGGTACGGCAGCCCCCGCCGGATCCACATCGAGACCGCCCGG<br>GAGGTGGGCAAGAGCTTCAAGGACCGGAAGGAGATCGAGAAGCGGC<br>AGGAGGAGAACCGGAAGGACCGGGAGAAAGCCCGCCCAAGTTCCG<br>GGAGTACTTCCCCAACTTCGTGGCGGAGCCCCAAGAGCAAGGACATC<br>CTGAAGCTGCGGCTGTACGAGCAGCAGCAGCGCAAGTGCTGTACA<br>GGGC AAGGAGATCAACCTGGGCCGGCTGAACGAGAAGGGCTACGT<br>GGAGATCGACCAAGCCCTGCCCTTCAGCCGGACCTGGGACGACAGC<br>TTCAACAACAAGGTGCTGGTGGTGGGCAGCGAGAACCAACAAGG<br>GCAACAGACCCCTACGAGTACTTCAACGGCAAGGACAACAGCCG<br>GGAGTGGCAGGAGTTC AAGGCCCGGGTGGAGACCAGCCGTTCCCC<br>CGGAGCAAG AAGCAGCGGATCCTGTGTCAGAAAGTTGACGAGGACG<br>GCTTCAAGGAGCGGAACCTGAACGACACCCGGTACGTGAACCGGTT<br>CCTGTGCCAGTTCTGTGGCCGACCGGATGCGGCTGACCGGCAAGGGC<br>AAGAAAGCGGGTGTTCGCCAGCAACGGCCAGATCACCAACCTGCTGC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 6 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GGGGCTTCTGGGGCTTGGGAAAGGTGCGGGCCGAGAACGACCGGCA<br>CCACGCCCTGGACGCCGTGGTGGTGGCCTCAGCACCGTGGCCATG<br>CAGCAGAAGATCACCCGGTTCTGTGCGGTACAAGGAGATGAACGCT<br>TCGACGGCAAGACCATCGACAAGGAGACCGGCGAGGTGCTGCACCA<br>GAAGACCCACTTCCCCCAGCCCTGGGAGTTCTTCGCCACGAGGTG<br>ATGATCCGGGTGTTCCGGCAAGCCCGACGGCAAGCCCGAGTTCGAGG<br>AGGCCGACACCCCTGGAGAAAGCTGCGGACCCCTGCTGCGCCGAGAAAGCT<br>GAGCAGCCCGGCCGAGGCCGTGCACGAGTACGTGACCCCTGTTC<br>GTAGCCCGGCCCCCAACCGGAAGATGAGCGGCCAGGCCACATGG<br>AGACCGTGAAAGAGCGCCAGCGGCTGGACGAGGCGTGAGCGTGCT<br>GGGGTGCCCTGACCCAGCTGAAGCTGAAGGACCCTGGAGAAAGATG<br>GTGAACCGGGAGCGGGAGCCCAAGCTGTACGAGGCCCTGAAGGCC<br>GGCTGGAGGCCCAAGGACGACCCCGCCAAAGCCCTTCGCCGAGCC<br>CTTCTACAAGTACGACAAGGCCCGGCAACCGGACCCAGCAGGTGAAG<br>GCCGTGCGGGTGGAGCAGGTGCAGAAAGACCGGCGTGTGGGTGCGGA<br>ACCAACCGGCATCGCCGACACCGCCACCATGGTGGGGTGGACGT<br>GTTGAGAAAGGCGACAAAGTACTACCTGGTGCCCATCTACAGCTGG<br>CAGGTGGCCAAAGGCCATCCTGCCCGACCGGGCCGTGGTGCAGGGCA<br>AGGACGAGGAGGACTGGCAGCTGATCGACGACAGCTTCAACTTCAA<br>GTTCAGCCTGCACCCCAACGACCTGGTGGAGGTGATCACCAAGAAAG<br>GCCCGGATGTTCCGGCTACTTCGCCAGCTGCCACCGGGCACCGGCA<br>ACATCAACATCCGGATCCACGACCTGGACCCACAAAGATCGGCCAAGAA<br>CGGCATCCTGGAGGGCATCGGCGTGAAGACCGCCCTGAGCTTCCAG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 0】

|  |                                                                                                                                             |           |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|  | AAGTACCAGATCGACGAGCTGGGCAAGGAGATCCGGCCCTGCCGGC<br>TGAAGAAAGCGGCCCCCGTGCAGGAGCGGCAAGCGGACCGCGACGG<br>CAGCGAGTTCGAGAGCCCCAAGAAGAGCGGAAGGTGGAG | 365 ~ 375 |
|  | 未使用                                                                                                                                         |           |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 1】

|                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| XBG UTR<br>およびC a s 9<br>ORFを有する<br>mRNA転写産<br>物 | GGGAAGCUCAGAAUAAACGCCUCAACUUUGGCCGGAUCUUGCCACCAU<br>GGACAAGAGUACAGCAUCGCGCCUGGACAU CGGCACCAACAGCGUG<br>GGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCAGCAAGAAGU<br>UCAAGGUCUGGGCAACACCGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCU<br>GAUCGGCGCCCGUGCUUGGACAGCGGGGAGACCGCGAGGCCACC<br>AGACUGAAGAGAACCGCCAGAGAGAGAAUAACACAGAGAAAGAACAA<br>GAUUCUGUACCUAGGAGAGAUUUACAGCAACGAGAU GGCACAGGU<br>GGACGACAGCUUUUCCACAGACUGGAGGAGAGCUUCCUGGUGGAG<br>GAGGACAAAGAACGACGAGAGACACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGG<br>ACGAGGUGGCCUACCAAGAGAGUAACCCCAACCUUACCAACCUAG<br>AAAGAAGCUGGUGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCUAGAGACUUAUC<br>UACCUGGCCCGUGGCCCAUAUGAUCAAGUUCAGAGGCCACUUCUGA<br>UCGAGGGCGACUGAACCCCGACAAACAGCGACGUGGACAAAGCUUU<br>CAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACAGCUUUCGAGGAGAACCC<br>AUC AACGCCAGCGGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGAGGCCAGAC<br>UGAGCAAGAGCAGAAAGACUGGAGAACCUGAUCGCCAGCUGCCCGG<br>CGAGAAGAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCGUGAGCCUG<br>GGCCUGACCCCAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCCGAGGACG<br>CCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAA<br>CCUGCUGGCCCAAGAU CGGCAACAGUAACGCCGACCUUGUUCUGGCC<br>GCCAAGAACCUAGCGGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCUUGAGAG<br>UGAACACCGAGAUCAACAGGCCCCCGUGAGGCCAGCAUGAUCAA<br>GAGAUACGACGAGCACCAACAGGACCUGACCCUUGCAAGGCCUUG | 376 |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GUGAGACAGCAGCUGCCCCGAGAGAGUACAAGGAGAUUUUUCGACC<br>AGAGCAAGAACGGCUACGCCGCUACAU CGACGGCGCGCCAGCCA<br>GGAGGAGUUUCACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAGAGGAC<br>GGACCGAGGAGCUGCUGUGAAGCUGAACAGAGAGACCUUGCUGA<br>GAAGCAGAGAACCUUUCGACAACGGCAGCAUCCCCACAGAUCCA<br>CCUGGGCAGCUGCACGCCAUCCUGAGAGACAGGAGACUUCUAC<br>CCUUCUGAAGGACACACAGAGAGAGAGUCCGAGAGAUCCUGACCU<br>UCAGAAUCCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCAGAGGCCAACAGCAG<br>AUCCGCCUGGAUGACCAAGAAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGG<br>AACUUCGAGGAGGUGGAGCAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCUUCA<br>UCGAGAGAAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCAACGAGAAAGGU<br>GUGCCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAA<br>GAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGCAUGAGAAAGCCCG<br>CCUUCUGAGCGCGGAGCAGAGAAAGGCCAUCCUGGACCUGCUGUU<br>CAGACCAACAGAAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGACUAC<br>UUCAGAGAGAUCCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAU CAGCGCGUGG<br>AGGACAGAUUCACGCCAGCCUGGGCACCUACCAAGCUGCUGAA<br>GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAACGAGGAGAACGAGGAC<br>AUCCUGGAGGACAUCCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACAGAG<br>AGAUAGUCGAGGAGACUUGAAGACCUACGCCCAUCCUGUUCGACGA<br>CAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGAGAAAGAAUACACCGGCUGGGGC<br>AGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGCAUCAGAGACAAAGCAGCGG<br>GCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGGACGGCUUCGCCAACAG |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AAACUUCAGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUCAAGGAG<br>GACAUCCAGAAAGGCCAGUGAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACG<br>AGCAUCCGCCAACCUGGCCGCGAGCCCGCCAUCAAGAAAGGCAU<br>CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGC<br>AGACACAAAGCCCGAGAACAUUGUGAUCGAGUUGGCCAGAGAGAAC<br>AGACCACCCAGAAAGGCCAGAAAGAACAGCAGAGAGAGAAUGAAGAG<br>AAUGGAGGAGGGCAUCAAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAG<br>CACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAAGCUGUACCUGU<br>ACUACCUGCAGAACGGCAGAGACAUGUACGUGGACCAAGGUGCUGGGA<br>CAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUGGACCAUCCUGCCCCAG<br>AGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGAGACAACAAGGUGCUGACCAAGAA<br>GGCACAAAGAACAGAGGCAAGAGCGAACACGUGCCAGCGAGGAGGU<br>GGUGAAGAAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCCAAG<br>CUGAUCACCCAGAGAAAGUUCGACAAACCUGACCAGGCCGAGAGAG<br>GCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAAGGCCGGCUUCAUCAAAGAGACAGCU<br>GGUGGAGACCAAGACAGAUCAACAAGCAGGAGACGUGGCCAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAAGCUGAUCAAGAG<br>AGGUGAAGGUGAUCAACCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACUUCAG<br>AAAGGACUUCAGUUUACAAGGUGAGAGAGAUCAACAACUACCCAC<br>CACGCCCAAGACGCCUACCUAGAACGCCGUGGUGGCCACCGCCUGA<br>UCAAGAAAGUACCCAAAGCUGGAGAGCGAGUUCGUGUACGGCGACUA<br>CAAGGUGUACGACGUGAGAAAGAUCAUCGCCAAGAGCGGAGCAGGAG<br>AUCGGCAAGGCCACCGCCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCUAUGA |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 4】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACUUCUUCAAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUACAGAAA<br>GAGACCCUCUGAUCGAGACCCAAACGGCGAGACCGGCGAGAUCCUGUGG<br>GACAAGGGCAGAGACUUCGCCACCCGUGAGAAAAGGUCUGAGCAUGC<br>CCCAGGUGAACAUUCGUGAAGAAAGACCGAGGUGCCAGACCGGGGCUU<br>CAGCAAGGAGAGCAUCCUGCCCCAAGAGAAACAGCGACAAAGCUGAUC<br>GCCAGAAAGAGACUUGGGACCCCAAGAAAGUACGGCGGUUCGACA<br>GCCCCACCGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAA<br>GGGCAAGAGCAAGAGCUGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUC<br>ACCAUCAUGGAGAGAAAGCAGCUUCGAGAAAGAACCCCAUCGACUCC<br>UGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAAGGACCCUGAUCAUCAA<br>GCUGCCCCAAGUACAGCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCAGAAAGAGA<br>AUGCUGGCCAGCGCCGGCGAGCUGCAGAAAGGGCAACGAGCUGGCC<br>UGCCAGCAAGUACGUGAACUUCUGUACUUGGCCAGCCACUACGA<br>GAAGCUGAAGGGCAGCCCCGAGGACACCGAGCAGAAAGCAGCUGUUC<br>GUGGAGCAGCAACAGCACUACUUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCA<br>GCGAGUUCAGCAAGAGAGUGAUCUUGGCCGACGCCAACCUGGACAA<br>GGUGCUGAGCGCCUACACAAAGCACAGAGACAAAGCCAUACAGAGAG<br>CAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUUUCAUCCUGACCAACCUGGCGG<br>CCCCCGCGCCUUCAGUACUUCGACACCCACCAUCGACAGAAAGAG<br>AUACACCAAGCACCAAGGAGGUGUGGACGCCACCCUGAUCCACCCAG<br>AGCAUACACCGGCCUGUACGAGACCCAGAAUCGACCCUGAGCCAGCUGG<br>GCGGCGACGGCGGGCAGCCCCAAGAAAGAAAGAAAGGUGUGACU<br>AGCACCGCCUCAAGAAACACCCGAAUUGGAGUUCUAAAGCUACAUAA |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 5】

|  |                                                                                                                                                                                             |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | UACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAUAGCCAU<br>UCGUUUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUGA<br>GAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAA<br>AAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAAAAAACAAA |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 6】

|                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| XBG UTR<br>および表5の低<br>Aコドンをも<br>るCas9 O<br>RFをもつm<br>RNA転写産物 | GGGAAGCCUCAGAAUAAACGCCUCAAUUUGGCCGGAUCUGCCACCAU<br>GGACAAGAAAGUACUCCAUCCGCGCCUGGACAUCGGCACCAACUCCGUG<br>GGCUGGGCCGUGAUACCGACGAGUACAAAGGUGCCUCCAAAGAAAGU<br>UCAAGGUGCCUGGCAACACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCU<br>GAUCGGCGCCUGUGUUCGACUCCGGCGGAGACCGCGGAGGCCACC<br>CGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGGGUACACCGCGGGAAGAACCC<br>GGAUCUGCUACCGCAGGAGAUUUUCCUCCACGAGAUGGCCAAAGGU<br>GGACGACUCCUUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAG<br>GAGGACAAGAACGACGAGCGGCACCCCAUUCUCCGCAACAUCGUGG<br>ACGAGGUGGCCUACCAAGAGAGUACCCCAUCCUACCAUCCACCGCG<br>GAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAAGGCCGACCUCCGCGGCUGAUC<br>UACCUGGCCUUGGCCCAUAGAUCAAGUUCGGGGCCACUUCUUGA<br>UCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAAACUCCGACGUGGACAAGCUGUU<br>CAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAAGCUGUUCGAGGAGAACCC<br>AUCACGCGCUCGCGGUGGACGCGCAAGGCCAUCCUGUCCGCGCGG<br>UGUCCAAAGUCCCGCGGCGUGGAGAACCUGAUCCGCGGCGGCGG<br>CGAGAAGAAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCCGCGGCGGCGG<br>GGCCUGACCCCAACUUAAGUCCAAUUCGACCUCCGCGGAGGACG<br>CCAAAGCUGCAGCUGUCCAAAGGACACCUACGACGACCGUCCGACAA<br>CCUGCUGGCCCAAGUCCGGCGACCAAGUACGCGCGACCUUCCUGGCC<br>GCCAAGAACCUUGCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGG<br>UGAACACCGGAGUACCAAGGCCCGCCUGUCCGCGCUCUCCAUUCAA<br>GGGUACGACGAGCACCAACAGGACCUUGACCCUGCUGAAGGCCUUG | 377 |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 7 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GUGGGGAGCAGCUGCCCGAGAAAGUACAAGGAGAUUCUUUCGACC<br>AGUCCAAGAACGGCUACGCCGCUACAUCGACGGCGGCCUCCCA<br>GGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAGAUAGAC<br>GGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGC<br>GGAAGCAGCGGACCUUUGACAACGGGUCCAUCGCCACCAAGAUCCA<br>CCUGGGGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCAGGAGACUUCUAC<br>CCUUCUGAAGGACAACCGGAGAGAAGAUCGAGAGAAGAUCCUGACCU<br>UCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGCAACUCCCG<br>GUUCGCCUGGAUACCCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCGG<br>AACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAAGGGCCUCCGCCCAUCCUUA<br>UCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAAGAACUCCCAACGAGAAAGU<br>GCUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAAC<br>GAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCG<br>CCUCCUGUCCGGCGAGCAGAGAGAGCCAUCCUGGACCUGCUGUU<br>CAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAAGCUGAAGGAGACUAC<br>UUCAGAAGAUCCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCCCGCGUGG<br>AGGACCGGUUACAACGCCUCCUGGGCACCUACCAAGCUGCUGAA<br>GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUUGGACAACGAGGAGAACGAGGAC<br>AUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGG<br>AGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCCAACUGUUCGACGA<br>CAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGGCGGGUACACCGGCUGGGGC<br>CGGCUGUCCCGGAAGCUGAUCACCGGCACUCCGGGACAAAGCAGUCCG<br>GCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUUGACCCUUGACCCUUAAGGAG<br>GACAUCCAG AAGCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUCCACG<br>AGCACAUCCGCAACCUUGGCCGGUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAU<br>CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGC<br>CGGCACAAGCCCCGAGAACAUUCGUGAUCGAGAUGGCCCCGGGAGAAC<br>AGACCACCCAG AAGGCCAGAAAGAACUCCCGGAGCGGAUGAAGCG<br>GAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGUCCCCAGAUCCUGAAGGAG<br>CACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAGCUGUACCUGU<br>ACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUUGUACGUGGACCGAGGAGCUGGA<br>CAUCAACCGGCUUCCGACUACGACGUGGACCAUUCGUGCCCCCAG<br>UCCUCCUGAAGGACGACUCCAUCCGACAAAGGUGCUGACCCGGU<br>CCGACAAGAACCCGGGCAAGUCCGACACCGUGCCUCCGAGGAGGU<br>GGUGAAGAAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAG<br>CUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAAACCUGACCAAGGCCGAGCCGGG<br>GGGGCCUGUCCGAGCUGGACAAAGGCCGCUUCAAAGGGCAGCU<br>GGUGGAGACCCGGCAGAUCCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGGAC<br>UCCCGGAUGAACCCAGUACGACGAGAACGACAGCUGAUCCGGG<br>AGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAAGCUGGUGUCCGACUCCG<br>GAAGGACUCCAGUUCUACAAAGGUGCGGGAGAUCAACACUACCAC<br>CACGCCCCAGACGCCUACCUGAAACGCCCGUGGGUCCGCCUCCUGA<br>UCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGGACUA<br>CAAGGUGUACGACGUGCGGAAAGAUAGUCCCAAGUCCGAGCAGGAG<br>AUCGGCAAGGCCACCGCCAGUACUUCUUCUACUCCCAACAUCAUGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 7 9】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| ACUUCUUAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAA<br>GGGGCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGGGAGAUCCGUGGG<br>GACAAAGGCCGGGACUUCCGCCACCGUGCGGAAGGUGUGUCCAUGC<br>CCAGGUGAACAUCCGUGAAGAAAGACCGAGGUGCAGACCGCGGCCUU<br>CUCCAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAAGCUGAUC<br>GCCCGGAAGAAGACUGGGACCCCAAGAAAGUACGGCGGUUCGACU<br>CCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAA<br>GGCAAGUCCAAAGACUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUC<br>ACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUCCGAGAAAGAACCCCAUCGACUCC<br>UGGAGGCCAAGGCCUACAAGGAGGUGAAGAAAGGACCUGAUCUCAA<br>GCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGG<br>AUGCUGGCCUCCGCCGGGAGCUGCAAGGGAACGAGCUGGGCCC<br>UGCCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGUACCUGGCCUCCACUACGA<br>GAAGCUGAAGGCUCGCCCGAGGACAACGAGCAGAGCAGCUGUUC<br>GUGGAGCAGCACAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUUCU<br>CCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGAGCCAAACUUGGACAA<br>GGUGCUGUCCGCCUACAACAAAGCACCGGGACAAGCCAUCCGGGAG<br>CAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUACCCUGACCAACCUGGGCG<br>CCCCCGCCGUUCAAGUACUUCGACACCCACCAUCGACCGGAAGCG<br>GUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCAG<br>UCCAUACCCGCCUGUACGAGACCCGGAUCCUGUCCAGCUGG<br>GGGGCGACGGCGCGGCCUCCCCCAAGAAAGAGCGGAAGGUGGACU<br>AGCACAGCCUCAAAGAACACCCGGAUUGGAGUUCUAAAGCUACAUAA |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 0】

|  |                                                                                                                                                                             |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | UACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAUGUAGCCAU<br>UCGUUUCUGCUCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUGA<br>GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 1】

|                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| XBG UTR<br>および表5の低<br>U/Aコドン<br>を有するCas9<br>ORFを有する<br>mRNA転写産<br>物 | GGGAAAGCCUCAGAAUAAACGCCUCAACUUUUGGCCGGAUCUGCCACCAU<br>GGACAAGAAAGUACAGCAUCGGCCUGGACAUCCGGCACCAACAGCGUG<br>GGCUGGGCCGUGAUACCGACGAGUAACAAGGUGCCACGCAAGAAGU<br>UCAAGGUGCCUGGCAACACACCGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAACC<br>GAUCGGCGCCUGCUGUUCGACAGCGGGGAGACCGCGGAGGCCACC<br>CGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGGGUACACCGCGGGAAGAACC<br>GGAUCUGCUACCGCAGGAGAUUUUACGCAACGAGAUGGCCAAAGU<br>GGACGACAGCUUUUCCACCGGCUUGGAGGAGAUUUCCUGGUGGAG<br>GAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUUCUUGGCAACAUCGUGG<br>ACGAGGUGGCCUACCAAGAGAGUAUACCCCAUUAUCCACCGUGCG<br>GAAGAAGCUGGUGGACAGCACCGACAAAGGCCGACCUGCCGUGAUC<br>UACCUGGCCUGGCCCAUAGAUUAAAGUUCGGGGCCAUUCCUGA<br>UCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAAACAGCAGCGAGGACAAGCUGUU<br>CAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAAGCUUUCGAGGAGAACCC<br>AUCAACGCCACAGCGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGAGCGCCCGG<br>UGAGCAAGAGCCGGCGGCUUGGAGAACCUGAUCCGACCUGCCCGG<br>CGAGAAAGAAACGGCCUGUUCGGCAUCCUGAUCCGCCUGAGCCUG<br>GGCCUGACCCCAACUUCAAGAGCAACUUUGACCUUGGCCGAGGACG<br>CCAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACCUACGACGACGACCUUGGACAA<br>CCUGCUGGCCCAUAUCGGCGACCAAGUACGCCGACCUUUCUGGCC<br>GCCAAGAACCUAGCGACGCCAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGCGGG<br>UGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCUUGAGCGCCAGCAUGAUCAA<br>GGGUACGACGAGCACCAACAGGACCUUGACCCUGCUGAAGGCCUG | 378 |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GUGGGGAGCAGCUGCCCGAGAGAAUAACAAGGAGAUUUUUUCGACC<br>AGAGCAAGAACGGCUACGCCGCUACAUCGACGGCGCGCCAGCCA<br>GGAGGAGUUUACAAGUUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAAGGAC<br>GGACCGAGAGCUGCUGGUGAAGCUAAACCGGAGACCUUGCGC<br>GGAAGCAGCGGACCUUUGACAACGGCAGCAUCCCCACCAAGAUCCA<br>CCUGGGGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCAGGAGCAUUCUAC<br>CCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAAGUUCGAGAAUCCUGACCU<br>UCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGGCAACAGCCG<br>GUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCAUACCCCCUGG<br>AACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCUUCA<br>UCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGU<br>GCUGCCCAAGCACAGCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAAC<br>GAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGCAUGCGGAAGCCCG<br>CCUUCUGAGCGCGGAGCAGAAAGGCCAUCCUGGACCUCUGUU<br>CAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGCUAC<br>UUCAGAAGAU CGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAU CAGCGCGUGG<br>AGGACCGGUUCAAAGCCAGCCUGGGCACCUACCAAGACCUUGUAA<br>GAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGAC<br>AUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGG<br>AGAUGAUCGAGGAGCGGCUAGAAGACCUACGCCCAUCCUGUUCGACGA<br>CAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGCGGGCGGUACACCGGCUUGGGC<br>CGGCUAGCCGGAAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGAGCG<br>GCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGGACGGCUUCGCCAACCG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAACUUC AUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUCAAGGAG<br>GACAUCCAGAGGCCCCAGGUGAGGGGCCAGGGCGACAGCCUGCCACG<br>AGCACAUCCGCCAACCUUGGCCGGCAGCCCCGCCAUC AAGAAGGGCAU<br>CCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGC<br>CGGCACAAGCCCCGAGAACAUUGUGAUUGAGUGGCCCGGGAGAAC<br>AGACCACCCAGAGGGCCAGAAAGAACAGCCGGGAGCGGAUGAAGCG<br>GAUCGAGGAGGGCAUC AAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAGGAG<br>CACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAAGCUGUACCUGU<br>ACUACCUUGCCAGACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCCAGGAGCUGGA<br>CAUCAACCGGCUGAGCGACUACGACGUGGACCAUUGUGCCCCAG<br>AGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUUGGACAAAGGUGCUGACCCGGA<br>GCGACAAGAACCGGGCC AAGAGCGCAC ACGUGCCCAGCGAGGAGGU<br>GGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGGCGCAGCUGCUGAACGCCAAG<br>CUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAAACCUGACCAAGGCCGAGCGGG<br>GCGGCCUGAGCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUACAAGCGGCAGCU<br>GGUGGAGACCCGGCAGAUCAACCAAGCACGUGGCCAGAUCCUGGAC<br>AGCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACACAGCUGAUCCGGG<br>AGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGAGCAAGCUGGUGAGCGACUUCCG<br>GAAGGACUUC CAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACACUACCCAC<br>CACGCCACGACGCCUACCUGAAAGCCGUGGGUAGGCCACCGCCUGA<br>UCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGAGCGAGUUUGGUACGGCGACUA<br>CAAGGUGUACGACGUGCGGAGAGUAGUCCGCAAGAGCGGAGCAGGAG<br>AUCGGCAAGGCCACCGCC AAGUACUUCUUCACAGCAACAUCAUGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACUUCUUC AAGACCGAGAUCA C C C U G G C C A A C G G C G A G A U C C G G A A<br>G C G G C C C U G A U C G A G A C C A A C G G C G A G A C C G G C G A G A U C C U G U G G<br>G A C A A G G C C G G G A C U U C G C C A C C G U G C G G A A G G U C U G A G C A U G C<br>C C C A G G U G A A C A U C G U G A A G A A G A C C G A G G U G C A G A C C G G C G G C U U<br>C A G C A A G G A G A G C A U C C U G C C C A A G C G G A C A G C G A C A A G C U G A U C<br>G C C C G A A G A A G G A C U G G G A C C C A A G A A G U A C G G C G G C U U C G G A C A<br>G C C C A C C G U G G C C U A C A G C G U G C U G G U G G C C A A G G U G G A G A A<br>G G G C A A G A G C A A G A A G C U G A A G A G C G U G A A G G A G C U G C U G G G C A U C<br>A C C A U C A U G G A G C G G A G C A G C U U C G A G A A G A A C C C A U C G A C U U C C<br>U G G A G G C C A A G G C U A C A A G G A G G U G A A G A A G G A C C U G A U C A U C A A<br>G C U G C C C A A G U A C A G C C U G U U C G A G C U G G A G A A C G G C C G G A A G C G G<br>A U G C U G G C C A G C C C G G C G A G C U G C A G A A G G G C A A C G A G C U G G C C C<br>U G C C C A G C A A G U A C G U G A A C U U C C U G U A C C U G G C C A G C C A C U A C G A<br>G A A G C U G A A G G C A G C C C G A G G A C A C G A G C A G A A G C A G C U G U U C<br>G U G G A G C A G C A A G C A C U A C C U G G A C G A G A U C A U C G A G C A G A U C A<br>G C G A G U U C A G C A A G C G G G U G A U C C U G G C C G A C G C C A A C C U G G A C A A<br>G G U G C U G A G C G C C U A C A C A A G C A C C G G G A C A A G C C C A U C C G G G A G<br>C A G G C C G A G A A C A U C A U C C A C C U G U U C A C C C U G A C C A A C C U G G G C G<br>C C C C G C G C C U U C A A G U A C U U C G A C A C C A C C A U C G A C C G G A A G C G<br>G U A C A C C A G C A C C A A G G A G G U G C U G G A C G C C A C C C U G A U C C A C C A G<br>A G C A U C A C C G G C C U G U A C G A G A C C C G G A U C G A C C U G A G C C A G C U G G<br>G C G G C G A C G G C G G C A G C C C C A A G A A G A A G C G G A A G G U G A C U<br>A G C A C C A G C C U C A A G A A C A C C C G A A U G G A G U C U C U A A G C U A C A U A A |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 8 5】

|  |                                                |    |
|--|------------------------------------------------|----|
|  | UACCAACUUACACUUUACAAAAUUGUUUCCGCCAAAAUGUAGCCAU | 10 |
|  | UCGUAUCUGCUCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGA  |    |
|  | GAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATA   |    |
|  | AAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATA    | 20 |
|  |                                                |    |
|  |                                                | 30 |
|  |                                                |    |
|  |                                                | 40 |
|  |                                                | 50 |

【表 20 - 186】

|                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HiBitタグ、HSD<br>5' UTRおよびヒトALB<br>3' UTRを有するCas9<br>をコードするORFを有するmRNA転写産物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGGTGTGTG<br>TCGTTGCAGGCCCTATTTCGGATCCGCCACCATGGACAAGATACA<br>GCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAT<br>CACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGTAAGTTCAGGTCCCTGGGA<br>AACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC<br>TGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAACAAAGACTGAAGAGAAC<br>AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAGAACAAGAACTCTGCTACCTG<br>CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGTCGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCA<br>CGAAGAACAACCGATCTTCGGAACAATCGTCGACGAAGTCGCATAC<br>CACGAAAAGTACCCGACAAATCTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCG<br>ACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC<br>ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTG<br>AACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCC<br>AGCATACAACCAAGCTGTTTCGAAGAACAACCCGATCAACGCAAGCGG<br>AGTCGACGCACAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA<br>AGACTGGAAACAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAGAACG<br>GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA<br>CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAGACGCAAGCTGCAGCTG<br>AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA<br>TCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCGCAGCAAAAGAACCTGAG<br>CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC<br>ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAC |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

379

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACGAGACCTGACACTGCTGAAGGCAC TGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>TACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAA<br>AGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAACAGAAAGACT<br>GCTGGTC AAGCTG A A C A G A G A A G A C C T G C T G A G A A A G C A G A G A C A<br>TTCGACAAACGGAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGC A A T C C T G A G A A G A C A G G A A G A C T T C T A C C C G T T C C T G A A G G A<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCCTAC<br>TAGCTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA<br>C A A G A A A G A G C G A A G A A A C A A T C A C A C C G T G G A A C T T C G A A G A A G T<br>CGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACA<br>A A C T T C G A C A A A G A A C C T G C C G A A C G A A A A G G T C C T G C C G A A G C A C A<br>GCCGTGTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGT<br>C A A G T A C G T C A C A G A A G G A A T G A G A A A G C C G G C A T T C C T G A G C G G A<br>G A A C A G A A G A A G G C A A T C G T C G A C C T G C T G T T C A A G A C A A A C A G A A<br>A G G T C A C A G T C A A G C A G C T G A A G G A A G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A<br>A T G C T T C G A C A G C G T C G A A A T C A G C G G A G T C G A A G A C A G A T T C A A C<br>G C A A G C C T G G G A A C A T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T C A T C A A G G A C A<br>A G G A C T T C C T G G A C A A C G A A G A A A A C G A A G A C A T C C T G G A A G A C A T<br>C G T C C T G A C A C T G A C A C T G T T C G A A G A C A G A G A A A T G A T C G A A G A A<br>A G A C T G A A G A C A T A C G C A C A C C T G T T C G A C G A C A A G G T C A T G A A G C<br>A G C T G A A G A G A A G A A G A T A C A C A G G A T G G G G A A G A C T G A G C A G A A A<br>G C T G A T C A A C G G A A T C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A T C C T G |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAC TTCC TGAAGAGCGGACGGGATTTCGCAAAACAGAAAACCTTCATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGC<br>ACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAACCCAGACACACAGAAAG<br>GGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGA<br>TCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAA<br>CACACAGCTGCAGAAACGAAAGCTGTACCTGTACTACTCCTGCAGAAC<br>GGAAGAGACATGTACGTGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGA<br>GCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCCTGAAGGA<br>CGACAGCATCGAACAAAGGTCCCTGACAAAGAGCGACAAAGAACAGA<br>GGAAAGAGCGACAAACGTCCCGAGCGAAGAAAGTCGTCAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGTCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACTGACAAAGGCAGAGAGAGGACTGAGCGAA<br>CTGGACAAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAGAC<br>AGATCAACAAAGCACGTGCAACAGATCCTGGACAGCAAGAAATGAACAC<br>AAAGTACGACGAAACCGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCCACACGCAACGACCGC<br>ATACCTGAACGCGAGTCGTGGGAACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTCAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 8 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGGAAGAGA<br>CTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCTGTAGCATGCCGATGCGCATCAACATC<br>GTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAGCA<br>TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGA<br>CTGGGACCCGAAGAAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCTCTGGTCTGTCGCAAGGTCGAAAAGGAAAGGCAAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAG<br>AAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGAAAGCAAGGGA<br>TACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA<br>GCGTGTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGAA<br>GCCGGAAAGACAAAGAACAGAAAGCATGTTCTGTCGAAACAGCAAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAG<br>AAGTCAATCCTGGCAGACGCAAACTGGACAAAGTCTGTAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGAGCACCGGCAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCAAA<br>AGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAGCCCCGAAGAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAACACCGG |  |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAAGAAAGATCAGCTAGCTAGC<br>CATCACATTTAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAAATAAGAGAAAG<br>AAATGAAGATCAATAGCTTATTCACTCTTTTCTTTTTCGTTGG<br>TGTAAGCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTTAATCAT<br>TTTGCCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAATAATGGAAGAAC<br>CTCGAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA<br>AAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 1】

|                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HiBiTタグ、CMV-1 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを有するCas9 をコードするORFを有するmRNA転写産物 | GGGCAGATCGCCCTGGAGAGCGCCATCCACGCTGTTTGTGACCTCCATC<br>GCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA<br>ACAGCGTCGGATGGGCAGTCAACAGACGAAATACAAAGTCCCGAG<br>CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGAAACACAGACACAGCATCAAG<br>AAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCAGACGGAGAAACAGCAG<br>AAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGATACACAAGAAG<br>AAAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATG<br>GCAAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC<br>TGGTCGAAGAAGACAAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAA<br>CATCGTCGACGAAAGTCGCATACCAAGAAAGTACCCGACAACTCTAC<br>CACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGA<br>GACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAAGGACA<br>CTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGTCCGAC<br>AAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCCGAA<br>AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAAGCAATCCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG<br>CTGCCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCAC<br>TGAGCCTGGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGC<br>AGAAAGCGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGAC<br>CTGGACAAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGT<br>TCCCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACAT<br>CCTGAGAGTCAACACAGAAATCAACAAGGCACCCGCTGAGCGCAAGC<br>ATGATCAAGAGATACGACGAAACACCAAGGACCTGACACTGCTGA | 380 |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGGCACTGGTCTAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAAATCTT<br>CTTCGACCCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGA<br>GCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAA<br>AGATGGACGGAAACAGAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA<br>CCTGCTGAGAAAGCAGAGAAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCCGAC<br>CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAG<br>ACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT<br>CCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTGCGACCGCTGGCAAGAGGA<br>AACAGCAGATTCGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA<br>CACCGTGGAACTTCGAAAGAGTCGTGCAAGGGAGCAAGCGCAACA<br>GAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACCTGCCGAAC<br>GAAAAGGTCCCTGCCGAAGCACAGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAG<br>TCTACAAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAG<br>AAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAAAGGCAATCGTCGAC<br>CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAGTCAAGTCAAGCAGCTGAAGG<br>AAGACTACTTCAAGAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAG<br>CGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAAGAC<br>CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAA<br>ACGAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTCGA<br>AGACAGAGAAAATGATCGAAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG<br>TTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAG<br>GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAA<br>GCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGCGATTCTC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 1 9 3】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GCAAAACAGAAAACCTTCATGTCAGGCTGATCCACGACGACAGCCCTGACAT<br>TCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG<br>CCTGCACGGAACACATCGCAAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAG<br>AAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACCTGGTCAAGG<br>TCATGGGAAGACACAAAGCCGGAACATCGTCAATCGAATTGGCAAG<br>AGAAAACAGACACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGA<br>ATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCC<br>TGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAAGCT<br>GTACCTGTACTACCTGCAGAACCGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAG<br>GAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACATCG<br>TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAAGGTCCT<br>GACAAAGAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGACAACTCCCGAGC<br>GAAGAAAGTCGTCAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGA<br>ACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACTGACAAAGGC<br>AGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAG<br>AGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGATCAACAAGCACGTCGCACAGA<br>TCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCT<br>GATCAGAGAAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC<br>GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA<br>ACTACCAACACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGTCTAC<br>GGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAGAGGCG<br>AACAGGAAATCGGAAAAGGCAACAGCAAAAGTACTTCTTCTACAGCAA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 4】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| CATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAA<br>ATCAGAAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAA<br>TCGTCTGGGACAAGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGTCTCT<br>GAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACA<br>GGAGGATTTCAGCAAGGAAGCATCTCTGCCGAAAGAAACAGCGACA<br>AGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAAGTACGGAGG<br>ATTGACAGCCGACAGTCGCATACAGCGTCTCTGCTGCTGCAAG<br>GTCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACCTGC<br>TGGGAATCACAAATCATGTGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAGAACCCGAT<br>CGACTTCTGTGAAGCAAGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTG<br>ATCATCAAGCTGCCGGAAGTACAGCCTGTTCGAACCTGGAAACGGAA<br>GAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAACTGCAGAAAGGGAACGA<br>ACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC<br>CACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACACGAAACAGAAAGC<br>AGCTGTTCTGTGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGA<br>ACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAAAC<br>CTGGACAAAGGTCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGAGACAAAGCCGA<br>TCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAA<br>CCTGGAGCACCCGGCAGCATTCAAAGTACTTCGACACAAACAATCGAC<br>AGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGA<br>TCCACACAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAG<br>CCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAAGCCCGAAGAAAGAAAGAGAAAG<br>GTCAGCGAAAAGCGCAACACCGGAAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGT |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | TCAAGAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTTAAAAAGCATCTCAGC<br>CTACCATGAGAAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC<br>ATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAAACACCCGTCTAAA<br>AAACATAAAATTTCCTTTTAAATCAATTTTGCCCTCTTTTCTCTGTGCTCA<br>ATTAAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAAAAAAAANAANAANAANA<br>AAAAAAAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANA<br>ANAANAANAANAANA |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 6】

|                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| H i B i T タ<br>グ、CMV-2<br>5' UTRお<br>よびトALB<br>3' UTRを<br>有するC a s 9<br>をコードするO<br>RFを有するm<br>RNA転写産物 | GGGAGAAGACACCGGGACCGGATCCAGCCTCCGGGCCGGGAACGGC<br>GCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA<br>ACAGCGTCGGATGGGCAGTCAACAGACGAAATACAAAGTCCCGAG<br>CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAG<br>AAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAACAGCAG<br>AAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAG<br>AAGAACAGAAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATG<br>GCAAAAGTCCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC<br>TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAGAACACCCGATCTTCGGAAA<br>CATCGTCGACGAAAGTGGCATACCAAGAAAGTACCCGACAAATCTAC<br>CACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGA<br>GACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACA<br>CTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACACACAGCGTCCGAC<br>AAGCTGTTCAATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACAGCTGTTCCGAA<br>AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCCACGCAAGGCAATCCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG<br>CTGCCGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCAC<br>TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGC<br>AGAGACGCAAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGAC<br>CTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGT<br>TCCCTGGCAGCAAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACAT<br>CCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGC<br>ATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACGAGGACCTGACACTGCTGA | 381 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 20 - 197】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | AGGCACCTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGGAAAAGTACAAGGAAAATCTT<br>CTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCCAGGATACATCGACGGAGGA<br>GCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAA<br>AGATGGACGGAAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA<br>CCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACACCGAAGCATCCCGCAC<br>CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCCAATCCTGAGAAAGACAGGAAG<br>ACTTCTACCCGTTCTGTGAAAGGACACAGAGAAAGATCGAAAGAT<br>CCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA<br>AACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA<br>CACCGTGGAACCTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACCA<br>GAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAC<br>GAAAAGGTCCCTGCCGAAGCACACGCCCTGCTGTACGAATACTTCACAG<br>TCTACAAACGAAC TGACAAAGGTCAAGTACGTACACAGAGGAATGAG<br>AAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCGTCGAC<br>CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGG<br>AAGACTACTTCAAGAAGATCGAAATGCTTCGACACAGCGTCGAAATCAG<br>CGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCCAAGCCTGGGAACATACCCACGAC<br>CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAA<br>ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCCTGACACTGACACTGTTCTGA<br>AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCCACACCTG<br>TTCGACGACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAG<br>GATGGGGAAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAA<br>GCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGCGATTC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 20 - 198】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| GCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCCTGACAT<br>TCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG<br>CCTGCACGAACACATCGCAAACTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAG<br>AAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGGAAGTGGTCAAGG<br>TCATGGGAAGACACAAAGCCGGAACATCGTCAATCGAATGGCAAG<br>AGAAAACGAGACAAACACAGAAAGGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGA<br>ATGAAGAGAAATCGAAGAAAGAAATCAAGGAACCTGGGAAGCCAGATCC<br>TGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAAACGAAAAGCT<br>GTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCCAG<br>GAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCCACATCG<br>TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAAACAGGTCCT<br>GACAAAGAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAGCGACAAAGTCCCGAGC<br>GAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGA<br>ACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCCGACAACTGACAAAGGC<br>AGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAGGCAGGATTCATCAAG<br>AGACAGCTGGTCGAAACAAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGA<br>TCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGACGAAACGACAAAGCT<br>GATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC<br>GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA<br>ACTACCAACCAAGCACAGCAGCATACCTGAACGCAAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAAATTCGTCTAC<br>GGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCG<br>AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAGTACTTCTTCTACAGCAA |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 1 9 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | CATCATGAACCTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAACCGGAGAA<br>ATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGAGAAA<br>TCGTCGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCCAACAGTCAGAAAGTCCCT<br>GAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACA<br>GGAGGATTTCAGCAAGGAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACA<br>AGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAGTAAGTACGGAGG<br>ATTGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCCTGGTCGTCGCAAAAG<br>GTGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGC<br>TGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGAT<br>CGACTTCCTGGAAAGCAAAAGGGATACAGGAAGTCAAGAAAGGACCTG<br>ATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCGTTCGAACTGGAAAACCGGAA<br>GAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGA<br>ACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGC<br>CACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAACGACAGAACG<br>AGCTGTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGA<br>ACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAAAC<br>CTGGACAAAGGTCTGAGCGCATACAAACAAAGCAAGACAAAGCCGA<br>TCAGAGAACAGGCAGAAACATCATCCACCTGTTACACTGACAAA<br>CCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAGGTACTTCGACACAAACATCGAC<br>AGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGA<br>TCCACCCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAG<br>CCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAAGAAAGAGAGAAAG<br>GTCAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGT |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

|                                                  |  |
|--------------------------------------------------|--|
| TCAAGAAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACATTTTAAAGCATCTCAGC  |  |
| CTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC  |  |
| ATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGGCCAACACCCCTGTCTAAA   |  |
| AAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTTCTCTGTGCTTCA |  |
| ATTAAATAAAAAATGGAAGAACCCTCGAGAAAAAANAANAANAANA   |  |
| AAAAAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANA  |  |
| AAAAAANAANAANAANA                                |  |

50



【表 20 - 201】

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HiBiタ<br>ダ、CMV-3<br>5' UTRお<br>よびトALB<br>3' UTRを<br>有するCas9<br>をコードするO<br>RFを有するm<br>RNA転写産物 | GGGTGCATTGGAACGGGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACTCACCCG<br>GCCACCATGGACAAGAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA<br>ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG<br>CAAGAAGTTCAAGTCTCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAG<br>AAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCCGACAGCGGAGAAACAGCAG<br>AAGCAACAAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAG<br>AAGAACACAGAAATCTGTACCTGCAGGAATCTTCAGCAACGAAATG<br>GCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCC<br>TGGTCGAAGAAAGACAAAGAACGACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAA<br>CATCGTCGACGAAAGTCGCATACCCAGAAAGTACCCGACAAATCTAC<br>CACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGACACAGACAAAGGACAGCTGA<br>GACTGATCTACCTGGCCTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACA<br>CTTCCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCGAC<br>AAGCTGTTTCATCCAGCTGCTCCAGACATACAACCCAGCTGTTCCGAAG<br>AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAGGCAATCCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG<br>CTGCCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCCGGAACCTGATCGCAC<br>TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGC<br>AGAAAGCGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGAC<br>CTGGACAACTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGACAGACCTGT<br>TCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACAT<br>CCTGAGAGTCAACACAGAAATCAACAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGC<br>ATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACCCAGGACCTGACACTGCTGA | 382 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 2】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGGCACTGGTCTAGACAGCAGCTGCCGGAAAAAGTACAAAGGAAAATCTT<br>CTTCGACCAAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGA<br>GCAAGCCAGGAAGAAATTTCTACAAGTTTCATCAAGCCGATCCTGGAAA<br>AGATGGACGGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA<br>CCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCCGAC<br>CAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAG<br>ACTTCTACCCGTTCTGTGAAGGACAAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT<br>CCTGACATTCAGAAATCCCGTACTAGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA<br>AACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA<br>CACCGTGAACCTCGAAGAAGTCGTCTGACAAAGGAGCAAGCGCAC<br>GAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAACTGCCGAAC<br>GAAAAGGTCTGCGCAAGCACAGCCTGCTGTACGAAATACATTCACAG<br>TCTACAAACGAACCTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAGGAATGAG<br>AAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGAGCAATCGTCGAC<br>CTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAAGTCAAGCAGCTGAAAGG<br>AAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAG<br>CGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAAGAC<br>CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAA<br>ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGTGACACTGACACTGTTTGA<br>AGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG<br>TTCGACGACAAAGTTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAG<br>GATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAAATCAGAGACAA<br>GCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGGATTC |  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| GC AAA CAG A A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G A C G A C A G C C T G A C A T<br>T C A A G G A A G A C A T C C A G A A G G C A C A G G T C A G C G G A C A G G A G A C A G<br>C C T G C A C G A A C A C A T C G C A A A C C T G G C A G G A A G C C C G G C A A T C A A G<br>A A G G G A A T C C C T G C A G A C A G T C A A G G T C G T C G A C G A A C T G G T C A A G G<br>T C A T G G G A A G A C A A G C C G G A A A C A T C G T C A T C G A A A T T G G C A A G<br>A G A A A C C A G A C A A C A C A G A A G G A C A G A A A C A G A A C A G A G A A A G A<br>A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C<br>T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T<br>G T A C C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G<br>G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C C A C A T C G<br>T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T<br>G A C A A G A A G C G A C A A G A C A G A G G A A A G A G C G A C A A C G T C C G A G C<br>G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A<br>A C G C A A A G C T G A T C A C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C<br>A G A G A G A G G A G G A C T G A G C G A A C T G G A C A A G G C A G G A T T C A T C A A G<br>A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G A<br>T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A C G A C A A G C T<br>G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A T C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C<br>G A C T T C A G A A A G G A C T T C C A G T T C T A C A A G G T C A G A G A A A T C A A C A<br>A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C<br>A G C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C<br>G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G<br>A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T C T A C A G C A A |  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 20 - 204】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | CATCATGAACCTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAACGGAGAA<br>ATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAATAACAAACGGAGAAACAGGAGAAA<br>TCGTCGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCT<br>GAGCATGCCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAAGTCCAGACA<br>GGAGGATTTCAGCAAGGAAGGATCCTGCGAAGAGAAACAGCGACA<br>AGCTGATCGCAAGAAAGAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGG<br>ATTGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAG<br>GTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGC<br>TGGGAATCACAATCATGGAAAGAGAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGAT<br>CGACTTCTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTG<br>ATCATCAAGCTGCCGGAAGTACAGCCGTGTTGGAACCTGGAAAACGGAA<br>GAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGA<br>ACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGC<br>CACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAAGAACAGAAAGC<br>AGCTGTTCTGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGA<br>ACAGATCAGCGAATTTCAGCAAGAGAGTCACTCTGGCAGACGCAAAAC<br>CTGGACAAAGGTCTCTGAGCGCATACAAACAAGCACAGAGACAAAGCCGA<br>TCAGAGAAACAGGCAGAAACAATCATCCACCTGTTCACACTGACAAA<br>CCTGGGAGCACCCGCGAGCATTCAGTACTTCGACACAAACAATCGAC<br>AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTCTGGACGCAACACTGA<br>TCCACCCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAACAAGAAATCGACCTGAG<br>CCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAGAGAAAG<br>GTCAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGT |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | TCAAGAAAGATCAGCTAGCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAAGCATCTCAGC<br>CTACCATGAGAAATAAGAGAAAGAAAAATGAAGATCAATAGCTTATTC<br>ATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTTGTAAGCCAACACCCGTCTAAA<br>AAACATAAAATTTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTCTCTGTGCTTCA<br>ATTAAATAAATAATGGAAAGAACCTCGAGAAATAAATAAATAAATAA<br>AAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA<br>ATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 6】

|                       |                                                    |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| HiBiTタグ、HBA           | 383                                                |
| 5' UTRおよびヒトALB        | GGGCATAAAACCCCTGGCGCGGCTCGCGGCCCCGGCACTCTTCTGGTCCC |
| 3' UTRを有するCas9        | CACAGACTCAGAGAGAAACCCACCCGCCACCATGGACAAGAAGTACA    |
| をコードするORFを有するmRNA転写産物 | GCATCGGACTGGACATCGGAACAACAAGCGTCGGATGGGCAGTCAT     |
|                       | CACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGA     |
|                       | AAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAAGAACCTGATCGGAGCACTGC   |
|                       | TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAAGCAACAAGACTGAAGAGAAC   |
|                       | AGCAAGAAGAAGATACACAAGAAAGAAAGAACAGAAATCTGTCTACCTG  |
|                       | CAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAAGGTCGACGACAGCTTCT    |
|                       | TCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCCCTGGTCGAAGAAAGACAAGAAAGCA |
|                       | CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATAC     |
|                       | CACGAAAAGTACCCGACAACTACCACCTGAGAAAGAAAGCTGGTCG     |
|                       | ACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGC    |
|                       | ACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCCTGATCGAAGGAGACCTG    |
|                       | AACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCTATCCAGCTGGTCC   |
|                       | AGACATACAAACAGCTGTTTCGAAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGG    |
|                       | AGTCGACGCAAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGA    |
|                       | AGACTGGAAGAAACCTGATCGCAACAGCTGCCGGAGAAAGAAAGAACG   |
|                       | GACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCCGAA   |
|                       | CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGACGCAAGCTGCCAGCTG    |
|                       | AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACTGCTGGCACAGA      |
|                       | TCGGAGACCCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAACCTGAG    |
|                       | CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATC     |
|                       | ACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAAC     |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | ACCACGAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACCTGGTCAGACAGCAGCT<br>GCCGGAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>TAGGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCTACA<br>AGTTCAATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGACGGAAACAGAAACT<br>GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACAA<br>TTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAAGATCCACCTGGGAGAACTGC<br>ACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCCTGAAGGA<br>CAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTAC<br>TAGCTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCCGCATGGATGA<br>CAAGAAGAGCGAAGAAACATCAACCCGTGGAACCTTCGAAGAAGT<br>CGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACA<br>AACTTCGACAAAGAACCTGCCGAACGAAGAAGTCCCTGCCGAAGCACA<br>GCCCTGCTGTACGAAATACTTCACAGTCTACAAACGAACTGACAAAGGT<br>CAAGTACGTCACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCCGA<br>GAACAGAAAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAGACAAACAGAA<br>AGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGA<br>ATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAC<br>GCAAGCCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACA<br>AGGACTTCCTGGACAAACGAAGAAACGAAGACATCCTGGAAAGACAT<br>CGTCCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAA<br>AGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCAATGAAGC<br>AGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAA<br>GCTGATCAACGGAAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 0 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GACTTCC TGAAGAGCGACGGATTTCGCCAAACAGAAACTTTCATGCAGC<br>TGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGC<br>ACAGGTCAGCGGACAGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAAAC<br>CTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCA<br>AGGTCGTGACGAACTGGTCAAGGTCAATGGGAAGACACAAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACACAGAAAG<br>GGACAGAAAGAACAGCAGAGAAAGAAATGAAGAGAAATCGAAGAAAGAA<br>TCAAGGAAC TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAAA<br>CACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACTACCTGCAGAAC<br>GGAAAGAGACATGTACGTGGACCCAGGAACCTGGACATCAACAGACTGA<br>GCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGA<br>CGACAGCATCGACAAACAAAGTCTCTGACAAAGAAAGGACAAAGAACAGA<br>GGAAGAGCGGACAAACGTCCTCGAGCGGAAGATCGTCAAGAAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACTGACAAAGGCAAGAGAGGAGGACTGAGCGAA<br>CTGGACAAGGCAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGAC<br>AGATCAACAAAGCACGTCGCCACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAAACAC<br>AAAGTACGACGAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAATC<br>ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCAACCAAGCACACGACGC<br>ATACCTGAACGCGAGTCGTCGGAACACAGCACTGATCAAGAAAGTACCCG<br>AAGCTGGAAAGCGGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACG<br>TCAGAAAGATGATCGCAAAAGAGCGGAACAGGAAATCGGAAAGGCAAC |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 2 0 9】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACA<br>GAAATCACACTGGCAACCGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCG<br>AAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAAGGAAAGAGA<br>CTTCGCCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATC<br>GTCAAAGAACAGAAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCA<br>TCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGGA<br>CTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCA<br>TACAGCGTCTCTGGTCGTCGCAAAAGGTCGAAAAGGAAAGAGCAAGA<br>AGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAATCACAAATCATGGAAAG<br>AAGCAGCTTCGAAAGAAACCGATCGACTTCTGGAAAGCAAGGGA<br>TACAAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA<br>GCCTGTTCGAACTGGAAACCGGAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGC<br>AGGAGAACTGCAGAAAGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTAC<br>GTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGAA<br>GCCCGAAGACAAACGAACAGAACAGCTGTTCTCGAACACAGCACAA<br>GCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAG<br>AAGTCAATCCTGGCAGACGCAAAACCTGGACAAAGTCTGAGCGCAT<br>ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACAT<br>CATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGAGCATTC<br>AAGTACTTCGACACAAACATCGACAGAAAGAGATACACACAGCACAA<br>AGGAAGTCCCTGGACGCCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACT<br>GTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGA<br>GGAAGCCCCGAAGAAAGAGAAAGGTCAGCGAAAGCGCAACACCGG |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AAAGCGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTAGC<br>CATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGATAGAGAGAAAG<br>AAATGAAGATCAATAGCTTATTCAATCTCTTTTCTTTTCGTTGG<br>TGTAAGCCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTCTTTAATCAT<br>TTTGCCCTCTTTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAATAATGGAAGAAGC<br>CTCGAGAAAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 1】

|                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HiBiT<br>タグ、HBB<br>5' UTRお<br>よびヒトALB<br>3' UTRを<br>有するCas9<br>をコードするO<br>RFを有するm<br>RNA転写産物 | GGGACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACCTAGCAACCTCAAAAC<br>AGACACCGGATCTCGCCACCATGGACAAGAGTACAGCATCGGACT<br>GGACATCGGAACAACAGCGTCGGATGGGCAGTCAATCAGACGAA<br>TACAAGGTCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCTCTGGAAACACAGACA<br>GACACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGAGCACTGCTGTTCTGACAG<br>CGGAGAAACAGCAGAGCAAGCAACAGACTGAAGAGAAACAGCAAGA<br>AGATACACAAAGAAGAAGAACAGAACTCTGCTACCTGCAGGAATCT<br>TCAGCAACGAAATGGCAAGGTGAGCAGCAGCTTCTTCCACAGACT<br>GGAGAAAGCTTCTCTGGTCGAAGAAAGACAAGAACGACGAAAGACAC<br>CCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAAGAAAGT<br>ACCCGACAATCTACCACTGAGAAAGAAAGCTGGTCGACAGCACAGA<br>CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACCTGGCACACATGATC<br>AAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACA<br>ACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAA<br>CCAGCTGTTCGAAGAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCA<br>AAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAAA<br>ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAGAAAGAACGGACTGTTCTGG<br>AAACCTGATCGCACCTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGC<br>AACTTCGACCTGGCAGAAAGCGCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACA<br>CATACGACGACGACCTGGACAAACCTGCTGGCAACAGATCGGAGACCA<br>GTACGCAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAGAAACCTGAGCGACGCAATC<br>CTGCTGAGCGACATCTCTGAGAGTCAACACAGAAATCAACAAAGGCAC<br>CGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCAACGGA | 384 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | CC TGACACTGCTGAAGGCAC TGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAAG<br>TACAAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGAT<br>ACATCGACGGAGAGCAAGCCAGGAAGAAATTCACAAATTCAATCAA<br>GCCGATCCTGGAAAAAGATGGACGGAAACAGAGAACTGCTGGTCAAG<br>CTGAACAGAGAAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAAG<br>GAAGCATCCCGCACCCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT<br>GAGAAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAGAGGACAAACAGAGAA<br>AAGATCGAAAAAGATCCTGACATTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGAC<br>CGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCCGATGGATGACAAAGAAAGAG<br>CGAAGAAACAAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAG<br>GGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACA<br>AGAACCTGCCGAACGAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTA<br>CGAATACTTCACAGTCTACAAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTC<br>ACAGAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAAGA<br>AGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAACAGT<br>CAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGAC<br>AGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGG<br>GAACATACCAAGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCT<br>GGACAACGAAGAAACGAAAGACATCCTGGAAAGACATCGTCCTGACA<br>CTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGA<br>CATACGGACACCTGTTTCGACGACAAAGTCAATGAAGCAGCTGAAGAG<br>AAGAAATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC<br>GGAATCAGAGACAAAGCAGAGCGGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 3】

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| AGAGCGACGGATTTCGCCAAAACAGAAAACCTTCATGTCAGCTGATCCACGA<br>CGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAAACCTGGCCAGGAA<br>GCCCGGCAATCAAGAAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGA<br>CGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAAGCCGGAANAACATCGTC<br>ATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAAACAGAAAGGACAGAAAGA<br>ACAGCAGAGAAAAGATGAAGAGAAATCGAAGAAAGGAATCAAGGAAC<br>GGAAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTG<br>CAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGGAAGAGACA<br>TGTAAGTGCACAGGAACCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGA<br>CGTCGACCAACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATC<br>GACAAACAAGGTCCTGACAAAGAAGCGACAAAGAACAGAGGAAGAAGCG<br>ACAAAGTCCGAGCGGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTG<br>GAGACAGCTGCTGAACGCAAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGAC<br>AACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAAG<br>CAGGATTTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA<br>GCACGTGCAACAGATCCTGGACAGCAGAAATGAACACAAAGTACGAC<br>GAAAACGACAAAGCTGATCAGAGAAAGTCAAGGTCAACACACTGAAGA<br>GCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGT<br>CAGAGAAATCAACAACTACCAACCAAGCAGCAGCAGCATACCTGAAC<br>GCAGTCGTGGAACAGCACCTGATCAAGAAAGTACCCGGAAGCTGGAAA<br>GCGAATTTCGTCTACGGAGACTCAAAAGGTCTACGACGTCAGAAAGAT<br>GATCGCAAAAGAGCGAACAGGAAAATCGGAAAAGGCAACAGCAAAAGTAC |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | TTCTTCTACAGCAACATCATGTAACTTCTTCAAGACAGAAATCACAC<br>TGGCAAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGG<br>AGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACA<br>GTCAGAAAGGTCTCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGA<br>CAGAAGTCCAGACAGGAGGATTTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAA<br>GAGAAACAGCGACAAAGCTGATCGCAAGAAAGAAAGACTGGGACCCG<br>AAGAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC<br>TGGTCGTCGCAAGGTGCAAAAGGAAAGGAAAGAGCAAGAGCTGAAGAG<br>CGTCAAGGAACCTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGAACGCTTC<br>GAAAGAACCCGATCGACTTCTCTGGAAGCAAGGATACAAAGGAAG<br>TCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCTGA<br>ACTGGAATAACGGAAAGAAAGAGAAATGCTGGCAAGCGCAGGAACTG<br>CAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTC<br>TGTAACCTGGCAAGCCACTACGAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGA<br>CAACGAACAGAAAGCAGCTGTTCGTGAAACAGCACAAAGCACTACCTG<br>GACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAAATTCAGCAAGAGAGTCATCC<br>TGGCAGACGCAAACTGGACAAAGGTCTCTGAGCGCATACAAACAGCA<br>CAGAGACAAAGCCGATCAGAGAAACAGGCAGAAACATCATCCACCTG<br>TTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAAGTACTTCG<br>ACACAAACATCGACAGAAAGAGATACACAAAGCACAAAGGAAGTCCT<br>GGACGCAACACTGATCCACCCAGAGGATACACAGGACTGTACGAAACA<br>AGANTCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA<br>AGAAGAAGAGAAAGGTACAGCGAAAGCGCAACACCGGAAAGCGTCAG |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 5】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | CGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAGCTAGCCATCACAATTT<br>AAAAGCATCTCAGCCCTACCATGAGAAATAAGAGAGAAAATGAAGA<br>TCAATAGCTTATTCAATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCA<br>ACACCTGTCTAAAAACATAAATTTCCTTTTAAATCATTTTGCCCTCTT<br>TTCTCTGTGCTTCAATTAAATAAATAATGGAAAGAACCTCGAGAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 6】

|                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| HiBitタグ、XBG 5' UTRおよびヒトALB 3' UTRを有するCas9をコードするORFを有するmRNA転写産物 | GGGAAGCTCAGAAATAAACGGCTCAACTTTGGCCGGATCTCGCCACCA<br>TGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGT<br>CGGATGGGCAGTCATCAGACGAATACAAGTCCCGAGCAAGAAG<br>TTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAAC<br>TGATCGGAGCACTGTCTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAAGCAAC<br>AAGACTGAAGAGAAACAGCAAGAAAGATACACAAGAAAGAAAGAAC<br>AGAACTCTGCTACCTGCAGGAAATCTTTCAGCAACGAAATGGCAAGG<br>TCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAAGAAAGCTTCTGTGTCGA<br>AGAGACAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCTC<br>GACGAAGTCGCATACCAACGAAAGTACCCGACAAATCTACCACTGA<br>GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAAGGCAGACCTGAGACTGAT<br>CTACCTGGCACTGGCAACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTCTG<br>ATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAAACAGCGACGTCGACAAAGCTGT<br>TCATCCAGCTGGTCCAGACATACAAACCAGCTGTTTCGAAGAAACCC<br>GATCAACGC AAGCGGAGTCGACGCA AAGGCAATCCTGAGCGCAAGA<br>CTGAGCAAGAGCAGAAAGACTGGAA AACCCTGATCGCACAGCTGCCGG<br>GAGAA AAGAAAGAACGGACTGTTCGGAA AACCCTGATCGCACTGAGCCT<br>GGGACTGACACCCGAACCTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAAGAC<br>GCA AAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACACATACGACGACGACCTGGACA<br>ACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAAGTACGCAGACCTGTCTCTGGC<br>AGCAAAGAAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGA<br>GTCAAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA<br>AGAGATACGACGAAACACCAACGAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACT | 385 |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 2 1 7】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGAC<br>CAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCC<br>AGGAAGAAATCTACAAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAAGATGGA<br>CGGAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAAGACCTGCTG<br>AGAAAGCAGAGAACATTCGACAAACGGAAAGCATCCCGACCCAGATCC<br>ACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAAGACAGGAAGACTTCTA<br>CCCGTTCTGAAGGACAAACAGAGAAAGATCGAAAGATCCTGACA<br>TTCAGAAATCCCGTACTACGTCGGACCCGCTGGCAAGAGGAAACAGCA<br>GATTGGCATGGATGACAAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTG<br>GAACCTTCGAAGAAAGTCGTCGACAAAGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC<br>ATCGAAAGAAATGACAAACTTCGACAAAGAAACCTGCCGAACGAAAGG<br>TCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA<br>CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCAACAGAAAGGAATGAGAAAGCCG<br>GCATTCTGAGCGGAGAACACAGAAAGCAATCGTCGACCTGCTGT<br>TCAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAAGCAGCTGAAGGAAGACTA<br>CTTCAAGAAAGATCGAAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTC<br>GAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGA<br>AGATCATCAAGGACAAAGGACTTCCTGGACAAACGAGAAACGGAAGA<br>CATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGA<br>GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCTGACG<br>ACAAAGGTCAATGAAGCAGCTGAAGAGAAAGATACACAGGATGGGG<br>AAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAAGCAGAGC<br>GGAAAGACAAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCTGCAACA |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | GAAAC TTCA TGCA GCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTC AAGGA<br>AGACATCCAGAAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCAC<br>GAAACATCGCAAACTGGCAGGAAGCCGGCAATCAAG AAGGAA<br>TCCTGCAGACAGTCAAGGTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA TGGG<br>AAGACAC AAGCCGGA A A C A TCGTCA TCGA A A TGGCAAGAGAA A C<br>CAGACAA CACAGAAAGGACAGAAAGAA CAGCAGAGAAAGAA TGAAGA<br>GAATCGAAG AAGGAATCAAGGA A C TGGGAAGCCAGATCCTGAAGGA<br>ACACCCGGTCGAA A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A G C T G T A C C T G<br>TACTACCTGCAGAA C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G A A C T G G<br>ACATCA A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C C A C A T C G T C C C G C A<br>GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA C A A G G T C C T G A C A A G A<br>AGCGACAAG A A C A G A G G A A A G A G C G A C A A C G T C C C G A G C A A G A A G<br>TCGTCAAGAA G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A<br>GCTGATCA C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A<br>GGAGGAC TGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC<br>TGGTCGAA A A C A A G A C A G A T C A C A A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A<br>CAGCAGAA TGAACACAAAGTACGACGAA A A C G A C A A G C T G A T C A G A<br>GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCA<br>GAAAGGACTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA A C T A C C A<br>CCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAA C A G C A C T G<br>ATCAAGAAAGTACCCGAAGCTGGAAGCGGAATTCGTCTACGGAGACT<br>ACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCA A A G A G C G A A C A G G A<br>AATCGGAAAGGCAACAGCA A A G T A C T T C T T A C A G C A A C A T C A T G |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 1 9】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | AACTTCTTCAAGACAGAAAATCACACTGGCAAAACGGAGAAATCAGAA<br>AGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAATCGTCTG<br>GGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCGTGAGCATG<br>CCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGACAGAAAGTCCAGACAGGAGGAT<br>TCAGCAAGGAAGCATCTCTGCCGAGAGAAACAGCGACAAAGCTGAT<br>CGCAAGAAAGAAAGGACTGGGACCCGAAGAAATACGGAGGATTCGAC<br>AGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTCTGGTCGTCCGCAAAAGGTCGAAA<br>AGGGAAGAGCAAGAAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAT<br>CACAAATCATGGAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTC<br>CTGGAAAGCAAGGGATACAAAGGAAGTCAAGAAAGGACCTGATCATCA<br>AGCTGCCGGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAAGAAAGAG<br>AATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCGAAGAGGAACAGAACTGGCA<br>CTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACTGGCAAGCCACTACG<br>AAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACACAGCAACAGAAAGCAGCTGTT<br>CGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATC<br>AGCGAATTCAGCAAGAGAGATCATCTCTGGCAGACGCAAACTGGACA<br>AGGTCCCTGAGCGCATACAAACAAAGCACAGACAAAGCCGATCAGAGA<br>ACAGGCAGAAAAACATCATCCACCTGTTCCACTGACAAAACCTGGGA<br>GCACCGGCAGCATTTCAAGTACTTCGACACAAACAAATCGACAGAAAGA<br>GATACACAAAGCACAAAGGAAGTCCCTGGACGCAACACTGATCCACCA<br>GAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAAGAAATCGACCTGAGCCAGCTG<br>GGAGGAGACCGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAAGAAAGAAAGGTCAGCG<br>AAAGCGCAACACCGGAAAGCGTCAAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAA |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | GATCAGCTAGCTAGCCATCACATTATAAAGCATCTCAGCCTACCAT<br>GAGATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTTCATCTCTT<br>TTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAAACACCCGTCTAAAAACATA<br>AATTCTTTAATCATTTTGCCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTATA<br>AAAAATGGAAAGAACCTCGAGAAAAAANAANAANAANAANAANA<br>AAAAAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANAANA<br>AANAANAANA |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 1】

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS1を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKSKKFKVLGNTRHSHKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDS TDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLNLI AQLP<br>GEKKNGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDDLD<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYVDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD<br>RKDFQFYKVIENNYIIIAHDAVLA VVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D<br>YKVVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 386 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLA SHY<br>EKLKGS PEDNEQKQLFVEQHIIYLD EII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGSLAAKRSRT<br>T |  |
|--|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 3】

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS2を有するCasp9の7ミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKSKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVSDTKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEEPNINASGVDAKAILSARLSKSRRLNLI AQLP<br>GEKKNGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDL<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAIILSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYFFLKDNREKIEKILTFRI PYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHLSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPA I KKG<br>ILQTVKVVDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLT RSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITKHHVAQILD SRMNTKYDENDKLI REVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINNYIIHAHDA YLNAVVG TALI KKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 387 |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVLSMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELGLITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLYASHY<br>EKLLKGSPEDNQQLFVEQIHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSAAKRSRT | T |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

50



【表 2 0 - 2 2 5】

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS3を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSSTDKADRLIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAQLSKDITYDDLD<br>NLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HLGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMLIHDDSLTFKEDIKKAQVSGQDLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD<br>RKDFQFYKVVREINNYHHHADA YLNAVVGTA L IKKYPKLESEFVYGD<br>YKVVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 388 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 6】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLA SHY<br>EKLKGS PEDNEQKQLFVEQIKIY LDEIIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPAPAKRER<br>TT |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 7】

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NLS4を有するCas9のヌクレオチド配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTRHSIKKN<br>LIGALFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSADKADRLIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVVDKL<br>FIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDL<br>NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHISLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAICKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD<br>RKDFQFYKVR EINNYIIIIAIIIDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHY<br>EKLKGSPEQKQKFVEQIHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDA TLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSAKRPR<br>T |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 2 9】

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS5を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDDLD<br>NLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HILGELHAILRRQEDFYFLLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIERLKTYYAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDLVKVMGRIKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINN YHH AIDA YLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 390 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHY<br>EKLKGSPEdNEQKQLFVEQHIIHYLDEII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSR AAKRPRT<br>T |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 1】

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS6を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKFKVLGNTRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAIISARLSKSRLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDDL<br>NLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAIILSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGAQAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTFEDREMIERLKTYYAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENI VIEMARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITKHVAQI LDSRMNTKYDENDKLIREVKVI TLKSKLVSDF<br>RKDFQFYKVVREINNYIIIIAIIIDAYLNAVVGTA LIIKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 391 |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLYLA SHY<br>EKLKGS PEDNEQKQLFVEQIHKIYLD EII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYE TRIDLSQLGGDGGGSA AAKRSWS<br>MAA |  |
|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 2 3 3】

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS7を有するCas9のヌクレオチド配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDS TDKADRLIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDL<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDDLRRKQRTFDNGSIPHQI<br>HILGELHAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVVKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHISLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTYYAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDLVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINNYIIIIAIDAYLNAVVG TALKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 392 |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 4】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLA SHY<br>EKLKGS PEDNEQKQLFVEQH KHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYE TRIDLSQLGGDGGGSA AAKRVWS<br>MAF | 10 |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 20 |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 40 |
|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 50 |

【表 2 0 - 2 3 5】

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS8を有するCas9のアーミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDS TDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKD TYDDDL<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTFRIPIYVVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTYYAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDLVKVMGRIKPENIVIEMARENQTTKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINNYHHHAUDAYLNAVVG TALI K KYPKLESEFVYGD<br>YK VYDVVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 393 |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 6】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFA TVRKVLSMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLI ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVL VVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFENPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHY<br>EKLKGSPEQKQKFVEQHIIYLD EII EQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSA AAKRSWS<br>MAF |  |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 7】

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS9を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAETRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVSDTKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLNLI AQLP<br>GEKKNGLFGNLI ALSGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDDL<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELIIAILRRQEDFYPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS<br>RFAMMTRKSEETITPWNFEVVVKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKIISLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAPLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQSDLSHEHIANLAGSPAIIKKG<br>ILQTVKVVDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLI REVKVI TLKSKLVSDF<br>RKDFQFYKVI REINNYIIHAIHDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D<br>YKVDYDVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 394 |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 8】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHY<br>ECLKGSPEDNEQKQLFVEQHKIYLDIEIQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDATLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSA AAKRKYF<br>AA |  |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 3 9】

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NLS10を有するC a s 9のアミノ酸配列 | 395<br>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDS TDKADRLIYALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKL<br>FIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLLENLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKD TYDDDDLD<br>NLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>IILGELHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTYYAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTI LDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPA I KKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VVKKMKNYWRQLLNAKLI TQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVE TRQITKKHVAQILD SRMNTKYDENDKLLIREVKVITLKS KLV SDF<br>RKDFQFYK VREINNYHHHAIDAYLNAVVGTA L I K K Y P K L E S E F V Y G D<br>YK V Y D V R K M I A K S E Q E I G K A T A K Y F F Y S N I M N F F K T E I T L A N G E I R |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 4 0】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLYLASHY<br>EKLKGSPEQKQLFVEQHKKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLD<br>KVL SAYNKKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDA TLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSR AAKRKAF<br>AA |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

10

20

30

40

50



【表 2 0 - 2 4 1】

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| NLS11を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSPKKFKVLGNTDRHSIKKN<br>LIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRKKNRICYLQEIFSNEMAK<br>VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL<br>RKKLVDSSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKL<br>FIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLNLIAQLP<br>GEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDL<br>NLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMI<br>KRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGAS<br>QEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQI<br>HILGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPIYYVGPLARGNS<br>RFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEK<br>VLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPPAFLSGEQKKAIVDLL<br>FKTNRKVTVKQKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYYHDL<br>KIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKTIAHLFD<br>DKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTIIDFLKSDGFAN<br>RNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGGDSLHEHIANLAGSPAIKKG<br>ILQTVKVVDDELVKVMGRIHKPENIVIEMARENQTTQGGKNSRERMK<br>RIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQEL<br>DINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEE<br>VKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQ<br>LVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSD<br>RKDFQFYKVVREINNYHIAIDA YLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGD<br>YKVYDVVRKMI AKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIR | 396 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2 4 2】

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | KRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPMPQVNI VKKTEVQTGG<br>FSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVE<br>KGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLII<br>KLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLLASHY<br>EKLKGSPEQNEQKQLFVEQHKIHYLDEIEQISEFSKRVILLADANLD<br>KVL SAYNKHHRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRK<br>RYTSTKEVLDTLIIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSR AAKRKYF<br>AV |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

\*= P S 連結、「m」= 2' - O-Mc ヌクレオチド

10

20

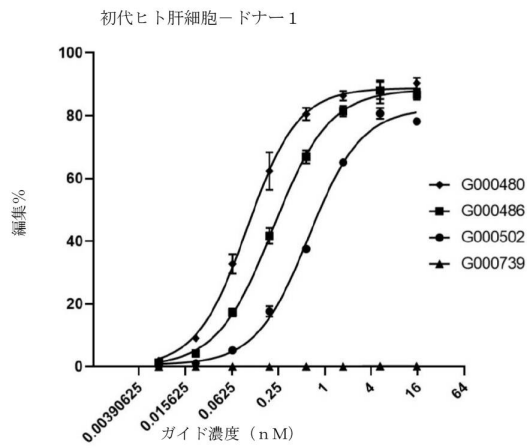
30

40

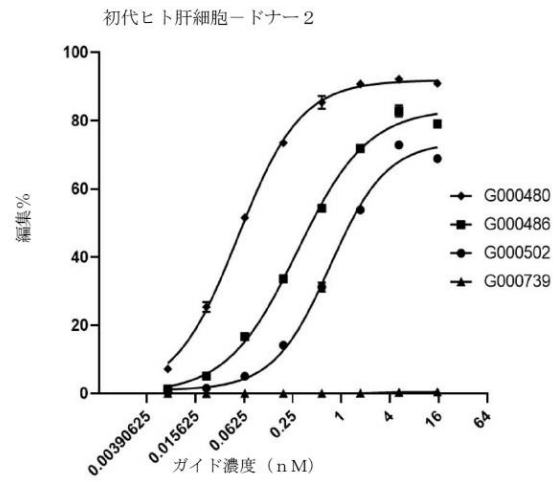
50

【図面】

【図 1 A】

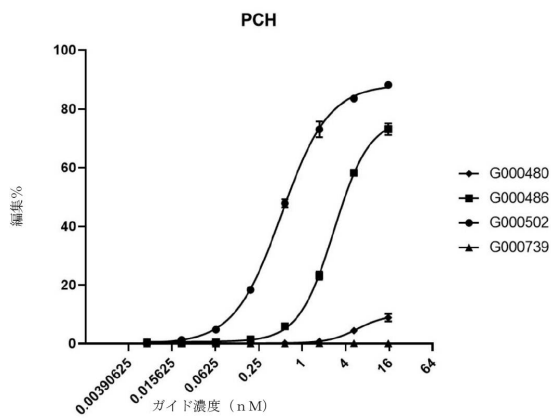


【図 1 B】

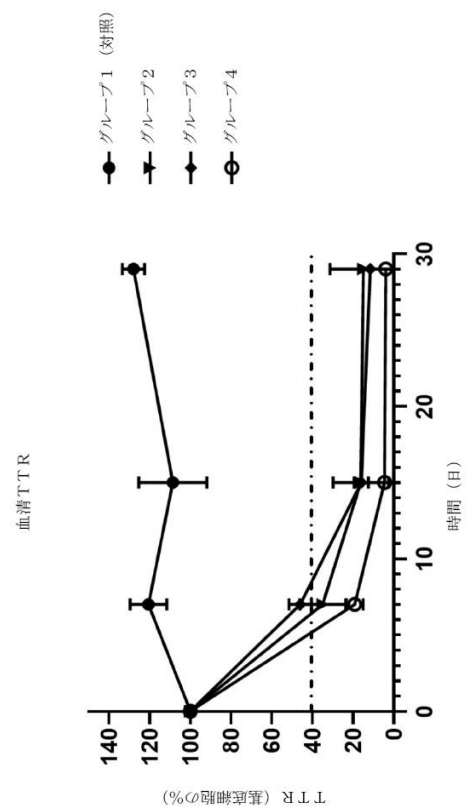


10

【図 2】



【図 3 A】



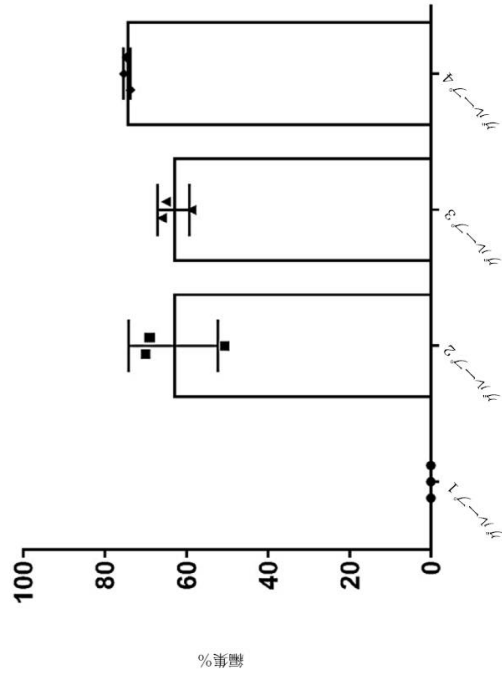
20

30

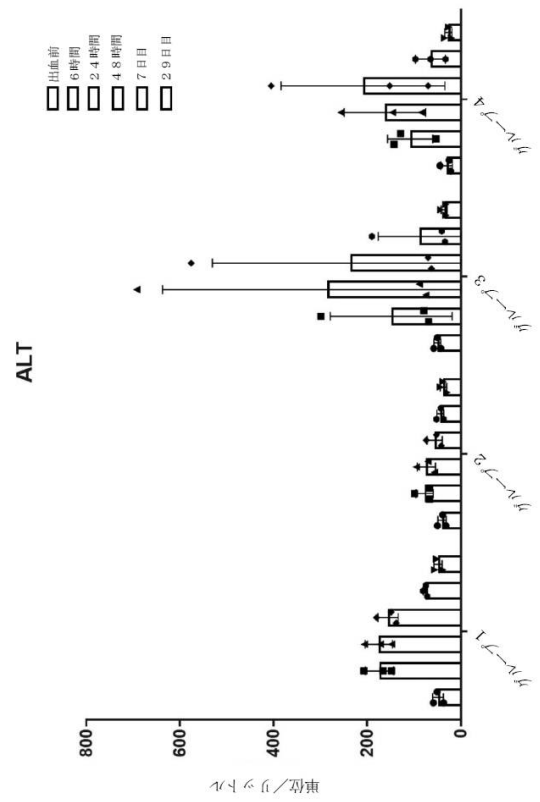
40

50

【図 3 B】



【図 3 C】



【配列表】

0007631215000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

|         |                  |         |         |       |
|---------|------------------|---------|---------|-------|
| A 6 1 P | 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P | 43/00   | 1 0 5 |
| A 6 1 P | 25/28 (2006.01)  | A 6 1 P | 25/28   |       |
| A 6 1 P | 9/04 (2006.01)   | A 6 1 P | 9/04    |       |
| A 6 1 K | 31/7088(2006.01) | A 6 1 K | 31/7088 |       |

- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
アレクサンダー, セス シー.
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
ウッド, クリスティ エム.
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
カンジョリア, アルティ マヘンドラ プラカーシュ
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
オダテ, ショブ
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
サイツァー, ジェシカ リン
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
レスカルボー, レイナード マイケル
- (72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0  
ストラップス, ワルター
- アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, エリー ストリート 4 0

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第2018/007871 (WO, A1)

国際公開第2014/093655 (WO, A2)

Nucl. Acids Res., 2000年, vol.28, no.1, p.292

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)