(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-500864
(P2021-500864A)
(43)公表日　令和3年1月14日(2021.1.14)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/09 | 110 | 4B050 |
| C12N 9/16 | (2006.01) | C12N | 9/16 | ZNAZ | 4C084 |
| C12N 15/113 | (2010.01) | C12N | 15/113 | Z | 4C086 |
| A61P 3/00 | (2006.01) | A61P | 3/00 | | 4C087 |
| A61P 25/04 | (2006.01) | A61P | 25/04 | | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 281 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-517500 (P2020-517500)
(86)(22)出願日　平成30年9月28日 (2018.9.28)
(85)翻訳文提出日　令和2年5月21日 (2020.5.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/053382
(87)国際公開番号　WO2019/067872
(87)国際公開日　平成31年4月4日 (2019.4.4)
(31)優先権主張番号　62/566,236
(32)優先日　平成29年9月29日 (2017.9.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/671,902
(32)優先日　平成30年5月15日 (2018.5.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　518196169
インテリア　セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０，スイート　１３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100093676
弁理士　小林　純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田　耕一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＴＴＲ遺伝子編集およびＡＴＴＲアミロイドーシスの治療用の組成物および方法

(57)【要約】
ＴＴＲ遺伝子内の編集、例えば二本鎖切断の導入のための組成物および方法が提供される。トランスサイレチンと関連付けられるアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を有する対象を治療するための組成物および方法が提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＴＴＲ遺伝子内の二本鎖切断（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、前記組成物が、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列を含むガイドＲＮＡ；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチドを含むガイドＲＮＡ；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列を含むガイドＲＮＡ
を含む、
方法。
【請求項２】
ＴＴＲ遺伝子を改変する方法であって、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結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列を含む、
方法。
【請求項３】
ＴＴＲと関連付けられるアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を治療する方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、ＡＴＴＲを治療することを含み、前記組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列を含む、
方法。
【請求項４】
ＴＴＲの血清濃度を低減させる方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、ＴＴＲの血清濃度を低減させることを含み、前記組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列を含む、
方法。
【請求項５】
対象においてＴＴＲを含むアミロイドまたはアミロイド原線維の蓄積を低減させまたは予防する方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、アミロイ

ドまたはアミロイド原線維の蓄積を低減させることを含み、前記組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、前記ガイドＲＮＡが、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または

ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列

を含む、

方法。

【請求項６】

ガイドＲＮＡを含む組成物であって、前記ガイドＲＮＡが、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または

ｃ．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％同一のガイド配列

を含む、

組成物。

【請求項７】

ガイドＲＮＡをコードするベクターを含む組成物であって、前記ガイドＲＮＡが、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または

ｃ．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％同一のガイド配列

を含む、

組成物。

【請求項８】

細胞または対象におけるＴＴＲ遺伝子内の二本鎖切断（ＤＳＢ）の誘導において使用するための、請求項６または７に記載の組成物。

【請求項９】

細胞または対象におけるＴＴＲ遺伝子の改変において使用するための、請求項６または７に記載の組成物。

【請求項１０】

対象におけるＴＴＲと関連付けられるアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）の治療において使用するための、請求項６または７に記載の組成物。

【請求項１１】

対象におけるＴＴＲの血清濃度の低減において使用するための、請求項６または７に記載の組成物。

【請求項１２】

対象におけるアミロイドまたはアミロイド原線維の蓄積の低減または予防において使用するための、請求項６または７に記載の組成物。

【請求項１３】

前記組成物が血清ＴＴＲレベルを低減させる、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法または請求項８～１２のいずれか１項に記載の使用のための組成物。

【請求項１４】

前記血清ＴＴＲレベルが、前記組成物の投与前の血清ＴＴＲレベルと比較して少なくとも５０％低減される、請求項１３に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項１５】

前記血清ＴＴＲレベルが、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％、または９９～１００％低減される、請求項１３に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項１６】

前記組成物がＴＴＲ遺伝子の編集を結果としてもたらす、請求項１～５または８～１５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項１７】

前記編集が、編集される集団のパーセンテージ（編集パーセント）として算出される、請求項１６に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項１８】

前記編集パーセントが前記集団の３０～９９％である、請求項１７に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項１９】

前記編集パーセントが、前記集団の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、請求項１７に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２０】

前記組成物が少なくとも１つの組織においてアミロイド沈着を低減させる、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法または請求項８～１９のいずれか１項に記載の使用のための組成物。

【請求項２１】

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１つまたは複数を含む、請求項２０に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２２】

アミロイド沈着が、前記組成物の投与の８週後に測定される、請求項２０または２１に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２３】

アミロイド沈着が、陰性対照または前記組成物の投与の前に測定されたレベルと比較される、請求項２０～２２のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２４】

アミロイド沈着が、生検試料中でおよび／または免疫染色により測定される、請求項２０～２３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２５】

アミロイド沈着が、陰性対照において見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％だけ低減される、請求項２０～２４のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２６】

アミロイド沈着が、前記組成物の投与の前に見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％だけ低減される、請求項２０～２５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２７】

前記組成物が少なくとも２回投与または送達される、請求項１～５または８～２６のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項２８】

前記組成物が少なくとも３回投与または送達される、請求項２７に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項２９】
前記組成物が少なくとも４回投与または送達される、請求項２７に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項３０】
前記組成物が、最大で５、６、７、８、９、または１０回投与または送達される、請求項２７に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項３１】
前記投与または送達が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５日の間隔で行われる、請求項２７～３０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項３２】
前記投与または送達が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週の間隔で行われる、請求項２７～３０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項３３】
前記投与または送達が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５か月の間隔で行われる、請求項２７～３０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項３４】
前記ガイド配列が配列番号：５～８２から選択される、請求項１～３３のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項３５】
前記ガイドＲＮＡが、ヒトＴＴＲ遺伝子中に存在する標的配列に少なくとも部分的に相補的である、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項３６】
前記標的配列が、ヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン１、２、３、または４にある、請求項３５に記載の方法または組成物。
【請求項３７】
前記標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン１にある、請求項３５に記載の方法または組成物。
【請求項３８】
前記標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン２にある、請求項３５に記載の方法または組成物。
【請求項３９】
前記標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン３にある、請求項３５に記載の方法または組成物。
【請求項４０】
前記標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン４にある、請求項３５に記載の方法または組成物。
【請求項４１】
前記ガイド配列がＴＴＲの正鎖中の標的配列に相補的である、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４２】
前記ガイド配列がＴＴＲの負鎖中の標的配列に相補的である、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４３】
第１のガイド配列がＴＴＲ遺伝子の正鎖中の第１の標的配列に相補的であり、かつ、前記組成物が、ＴＴＲ遺伝子の負鎖中の第２の標的配列に相補的な第２のガイド配列をさら

に含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４４】
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、配列番号：１２６の前記ヌクレオチドが前記ガイド配列にその３’末端において後続する、請求項１～４３のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４５】
前記ガイドＲＮＡがデュアルガイド（ｄｇＲＮＡ）である、請求項１～４４のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４６】
前記デュアルガイドＲＮＡが、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを含み、前記ｃｒＲＮＡが、配列番号：１２６のヌクレオチド配列を含み、配列番号：１２６の前記ヌクレオチドが前記ガイド配列にその３’末端において後続する、請求項４５に記載の方法または組成物。
【請求項４７】
前記ガイドＲＮＡがシングルガイド（ｓｇＲＮＡ）である、請求項１～４３のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項４８】
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、請求項４７に記載の方法または組成物。
【請求項４９】
前記ｓｇＲＮＡが配列番号：３の配列を含む、請求項４７に記載の方法または組成物。
【請求項５０】
配列番号：３における各Ｎが任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、前記Ｎが前記ガイド配列を形成し、かつ、前記ガイド配列がＣａｓ９をＴＴＲ遺伝子に標的化する、請求項４８または４９に記載の方法または組成物。
【請求項５１】
前記ｓｇＲＮＡが、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つおよび配列番号：１２６のヌクレオチドを含む、請求項４７～５０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項５２】
前記ｓｇＲＮＡが、配列番号：８７～１２４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％同一のガイド配列を含む、請求項４７～５１のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項５３】
前記ｓｇＲＮＡが、配列番号：８７～１２４から選択される配列を含む、請求項４７に記載の方法または組成物。
【請求項５４】
前記ガイドＲＮＡが少なくとも１つの修飾を含む、請求項１～５３のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項５５】
前記少なくとも１つの修飾が２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む、請求項５４に記載の方法または組成物。
【請求項５６】
前記少なくとも１つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、請求項５４または５５に記載の方法または組成物。
【請求項５７】
前記少なくとも１つの修飾が２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む、請求項５４～５６のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項５８】

前記少なくとも１つの修飾が、５’末端における最初の５つのヌクレオチドの１つまたは複数における修飾を含む、請求項５４～５７のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項５９】

前記少なくとも１つの修飾が、３’末端における最後の５つのヌクレオチドの１つまたは複数における修飾を含む、請求項５４～５８のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６０】

前記少なくとも１つの修飾が、最初の４つのヌクレオチドの間のＰＳ結合を含む、請求項５４～５９のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６１】

前記少なくとも１つの修飾が、最後の４つのヌクレオチドの間のＰＳ結合を含む、請求項５４～６０のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６２】

前記少なくとも１つの修飾が、５’末端における最初の３つ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、請求項５４～６１のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６３】

前記少なくとも１つの修飾が、３’末端における最後の３つ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、請求項５４～６２のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６４】

前記ガイドＲＮＡが配列番号：３の修飾ヌクレオチドを含む、請求項５４～６３のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６５】

前記組成物が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６６】

前記ガイドＲＮＡが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、請求項１～６５のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項６７】

前記ＬＮＰがＣＣＤ脂質を含む、請求項６６に記載の方法または組成物。

【請求項６８】

前記ＣＣＤ脂質がリピドＡまたはリピドＢである、請求項６７に記載の方法または組成物。

【請求項６９】

前記ＬＮＰが中性脂質を含む、請求項６６～６８に記載の方法または組成物。

【請求項７０】

前記中性脂質がＤＳＰＣである、請求項６９に記載の方法または組成物。

【請求項７１】

前記ＬＮＰがヘルパー脂質を含む、請求項６６～７０のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項７２】

前記ヘルパー脂質がコレステロールである、請求項７１に記載の方法または組成物。

【請求項７３】

前記ＬＮＰがステルス脂質を含む、請求項６６～７２のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項７４】

前記ステルス脂質がＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、請求項７３に記載の方法または組成物。

【請求項７５】
前記組成物がＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をさらに含む、請求項１～７４のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項７６】
前記組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡをさらに含む、請求項１～７５のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項７７】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がＣａｓクリベースである、請求項７５または７６に記載の方法または組成物。
【請求項７８】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がＣａｓ９である、請求項７７に記載の方法または組成物。
【請求項７９】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が修飾されている、請求項７５～７８のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項８０】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がニッカーゼである、請求項７５～７９のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項８１】
前記修飾されているＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が核局在シグナル（ＮＬＳ）を含む、請求項７９または８０に記載の方法または組成物。
【請求項８２】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓシステムからのＣａｓである、請求項７５～８１のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項８３】
前記組成物が医薬配合物であり、かつ薬学的に許容される担体をさらに含む、請求項１～８２のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項８４】
前記組成物が、ＴＴＲを含むアミロイドまたはアミロイド原線維を低減させまたは予防する、請求項１～５または８～８３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項８５】
前記アミロイドまたはアミロイド原線維が、神経、心臓、または胃腸管（ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ　ｔｒａｃｋ）にある、請求項８４に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項８６】
非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が、ＴＴＲ遺伝子におけるＤＳＢの修復の間に突然変異をもたらす、請求項１～５または８～８３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項８７】
ＮＨＥＪが、ＴＴＲ遺伝子におけるＤＳＢの修復の間にヌクレオチドの欠失または挿入をもたらす、請求項８６に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項８８】
ヌクレオチドの前記欠失または挿入が、ＴＴＲ遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス突然変異を誘導する、請求項８７に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項８９】
フレームシフトまたはナンセンス突然変異が、少なくとも５０％の肝細胞のＴＴＲ遺伝子において誘導される、請求項８７に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項９０】
フレームシフトまたはナンセンス突然変異が、５０％～６０％、６０％～７０％、７０

％または８０％、８０％～９０％、９０～９５％、９５％～９９％、または９９％～１００％の肝細胞のＴＴＲ遺伝子において誘導される、請求項８９に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９１】

ヌクレオチドの欠失または挿入が、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも５０倍またはより多くＴＴＲ遺伝子において起こる、請求項８７～９０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９２】

ヌクレオチドの前記欠失または挿入が、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ＴＴＲ遺伝子において起こる、請求項９１に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９３】

ヌクレオチドの前記欠失または挿入が、初代ヒト肝細胞において３、２、１、もしくは０未満または３、２、１、もしくは０に等しいオフターゲット部位において起こり、任意選択的に、前記オフターゲット部位が、前記初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、請求項８７～９２のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９４】

ヌクレオチドの前記欠失または挿入が、Ｃａｓ９過剰発現細胞においてヌクレオチドの欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数より少ない初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数で起こり、任意選択的に、前記オフターゲット部位が、前記初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、請求項９３に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９５】

前記Ｃａｓ９過剰発現細胞が、Ｃａｓ９を安定的に発現するＨＥＫ２９３細胞である、請求項９４に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９６】

初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の前記数が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣａｓ９ｍＲＮＡおよび前記ガイドＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解析することにより決定され、任意選択的に、前記オフターゲット部位が、前記初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、請求項９３～９５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９７】

初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の前記数が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣａｓ９ｍＲＮＡ、前記ガイドＲＮＡ、およびドナーオリゴヌクレオチドをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解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り決定され、任意選択的に、前記オフターゲット部位が、前記初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、請求項９３～９５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。

【請求項９８】

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、任意選択的に、前記ガイドＲＮＡが、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こるオフターゲット部位においてインデルを生成しない、請求項１～４３または４７～９７のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項９９】
前記組成物を投与することが、前記対象においてＴＴＲのレベルを低減させる、請求項１～５または８～９８のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１００】
ＴＴＲの前記レベルが少なくとも５０％低減される、請求項９９に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０１】
ＴＴＲの前記レベルが、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％または８０％、８０％～９０％、９０～９５％、９５％～９９％、または９９％～１００％低減される、請求項１００に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０２】
ＴＴＲの前記レベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、または痰において測定される、請求項１００または１０１に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０３】
ＴＴＲの前記レベルが、肝臓、脈絡叢、および／または網膜において測定される、請求項１００または１０１に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０４】
ＴＴＲの前記レベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を介して測定される、請求項９９～１０３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０５】
前記対象がＡＴＴＲを有する、請求項１～５または８～１０４のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０６】
前記対象がヒトである、請求項１～５または８～１０５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０７】
前記対象がＡＴＴＲｗｔを有する、請求項１０５または１０６に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０８】
前記対象が遺伝性ＡＴＴＲを有する、請求項１０５または１０６に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１０９】
前記対象がＡＴＴＲの家族歴を有する、請求項１～５、８～１０６、または１０８のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１０】
前記対象が家族性アミロイド多発ニューロパチーを有する、請求項１～５、８～１０６、または１０８～１０９のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１１】
前記対象が、ＡＴＴＲの神経症状のみを有するか、または主にＡＴＴＲの神経症状を有する、請求項１～５または８～１１０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１２】
前記対象が家族性アミロイド心筋症を有する、請求項１～５または８～１１０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１３】
前記対象が、ＡＴＴＲの心臓症状のみを有するか、または主にＡＴＴＲの心臓症状を有する、請求項１～５、８～１０９、または１１２のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１４】
前記対象が、Ｖ３０突然変異を有するＴＴＲを発現する、請求項１～５または８～１１

３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１５】
前記Ｖ３０突然変異が、Ｖ３０Ａ、Ｖ３０Ｇ、Ｖ３０Ｌ、またはＶ３０Ｍである、請求項１１４に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１６】
前記対象が、Ｔ６０突然変異を有するＴＴＲを発現する、請求項１～５または８～１１３のいずれか１項に記載の請求項の方法または使用のための組成物。
【請求項１１７】
前記Ｔ６０突然変異がＴ６０Ａである、請求項１１６に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１１８】
前記対象が、Ｖ１２２突然変異を有するＴＴＲを発現する、請求項１～５または８～１１３のいずれか１項に記載の請求項の方法または使用のための組成物。
【請求項１１９】
前記Ｖ１２２突然変異が、Ｖ１２２Ａ、Ｖ１２２Ｉ、またはＶ１２２（－）である、請求項１１８に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２０】
前記対象が野生型ＴＴＲを発現する、請求項１～５または８～１１９のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２１】
前記対象が、Ｖ３０、Ｔ６０、またはＶ１２２突然変異を有するＴＴＲを発現しない、請求項１～５、８～１０７、または１２０のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２２】
前記対象が、病理学的突然変異を有するＴＴＲを発現しない、請求項１～５、８～１０７、または１２０～１２１のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２３】
前記対象が野生型ＴＴＲについてホモ接合である、請求項１２１に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２４】
投与後に前記対象が、感覚運動性ニューロパチーの症状における改善、安定化、または変化の緩慢化を有する、請求項１～５または８～１２３のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２５】
感覚性ニューロパチーにおける前記改善、安定化、または変化の緩慢化が、筋電図、神経伝導検査、または患者報告アウトカムを使用して測定される、請求項１２４に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２６】
前記対象が、鬱血性心不全の症状における改善、安定化、または変化の緩慢化を有する、請求項１～５または８～１２５のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２７】
鬱血性心不全における前記改善、安定化、または変化の緩慢化が、心臓バイオマーカー検査、肺機能検査、胸部Ｘ線、または心電図記録法を使用して測定される、請求項１２６に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２８】
前記組成物または医薬配合物がウイルスベクターを介して投与される、請求項１～５または８～１２７のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１２９】
前記組成物または医薬配合物が脂質ナノ粒子を介して投与される、請求項１～５または

８～１２７のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１３０】
前記対象が、前記組成物または配合物を投与する前にＴＴＲ遺伝子における特定の突然変異について試験される、請求項１～５または８～１２９のいずれか１項に記載の方法または使用のための組成物。
【請求項１３１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１３９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：１９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項１４６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１４９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：２９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１５９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３６である、請求項１～１３

０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：３９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１６９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：４９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１７９】

配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：５９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１８９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９０】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：６９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。

【請求項１９６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項１９９】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７３である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２００】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７４である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０１】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７５である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０２】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７６である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０３】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７７である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０４】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７８である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０５】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：７９である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０６】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：８０である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０７】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：８１である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０８】
配列番号：５～８２から選択される前記配列が配列番号：８２である、請求項１～１３０のいずれか１項に記載の方法または組成物。
【請求項２０９】
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、請求項６～２０８のいずれかに記載の組成物または配合物の使用。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０１７年９月２９日に出願された米国仮出願第６２／５５６，２３６号、および２０１８年５月１５日に出願された米国仮出願第６２／６７１，９０２号に対する優先権の利益を主張し、これらの仮出願は、参照することにより全体が組み込まれる。
【０００２】

本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含有し、該配列表は、参照することにより全体が本明細書に組み込まれる。２０１８年９月２７日に作成された前述のＡＳＣＩＩコピーは２０１８－０９－２７＿０１１５５－００１３－ＰＣＴ＿ＳＴ２５．ｔｘｔという名称であり、４１７，４７１バイトのサイズである。

【背景技術】

【０００３】

トランスサイレチン（ＴＴＲ）は、ＴＴＲ遺伝子により産生されるタンパク質であり、通常、全身にわたりレチノールおよびチロキシンを輸送するために機能する。ＴＴＲは主に肝臓において合成され、小さい比率は脈絡叢および網膜において産生される。ＴＴＲは、通常、可溶性の四量体タンパク質として血液中を循環する。

【０００４】

四量体の安定性を破壊し得るＴＴＲの病原性変種がＴＴＲ遺伝子の突然変異体アレルによりコードされることがある。突然変異体ＴＴＲは、アミロイド（すなわち、ミスフォールディングしたＴＴＲタンパク質の凝集物）を生成し得るミスフォールディングしたＴＴＲを結果としてもたらし得る。一部の場合には、ＴＴＲの病原性変種は、アミロイドーシス、またはアミロイドの蓄積の結果としてもたらされる疾患に繋がり得る。例えば、ミスフォールディングしたＴＴＲ単量体は、末梢神経、心臓、および胃腸管などの組織内で重合してアミロイド原線維となり得る。アミロイドプラークはまた、ミスフォールディングしたＴＴＲに沈着した野生型ＴＴＲを含み得る。

【０００５】

野生型ＴＴＲのミスフォールディングおよび沈着はまた、６０歳またはそれより高い年齢の男性において観察され、心臓リズムの問題、心不全、および手根管と関連付けられる。

【０００６】

ＴＴＲの沈着により特徴付けられるアミロイドーシスは、「ＡＴＴＲ」、「ＴＴＲ関連アミロイドーシス」、「ＴＴＲアミロイドーシス」もしくは「ＡＴＴＲアミロイドーシス」、「ＡＴＴＲ家族性アミロイドーシス」（家族における遺伝子突然変異と関連付けられる場合）、または「ＡＴＴＲｗｔ」もしくは「野生型ＡＴＴＲ」（野生型ＴＴＲのミスフォールディングおよび沈着から生じる場合）と称されることがある。

【０００７】

ＡＴＴＲは広範な症状を示すことができ、異なるクラスのＡＴＴＲを有する患者は異なる特徴および予後を有し得る。ＡＴＴＲの一部のクラスとしては、家族性アミロイド多発ニューロパチー（ＦＡＰ）、家族性アミロイド心筋症（ＦＡＣ）、および野生型ＴＴＲアミロイドーシス（ｗｔ－ＴＴＲアミロイドーシス）が挙げられる。ＦＡＰは一般的に感覚運動性ニューロパチーを示し、ＦＡＣおよびｗｔ－ＴＴＲアミロイドーシスは一般的に鬱血性心不全を示す。ＦＡＰおよびＦＡＣは、通常、ＴＴＲ遺伝子における遺伝子突然変異と関連付けられ、ＴＴＲ遺伝子における１００より多くの異なる突然変異が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における遺伝子突然変異とは関連付けられない。世界中で約５０，０００人の患者がＦＡＰおよびＦＡＣに罹患している可能性があると推定される。

【０００８】

ＴＴＲにおける１００より多くの突然変異がＡＴＴＲと関連付けられるが、ある特定の突然変異はニューロパチーおよび／または心筋症とより密接に関連付けられている。例えば、ＴＴＲのＴ６０における突然変異は心筋症およびニューロパチーの両方と関連付けられ、Ｖ３０における突然変異はニューロパチーとより関連付けられ、Ｖ１２２における突然変異は心筋症とより関連付けられる。

【０００９】

広範な治療アプローチがＡＴＴＲの治療のために研究されてきたが、疾患進行を止め、生活の質を向上させる承認された薬物はない。肝臓移植がＡＴＴＲの治療のために研究されてきたが、その使用は有意なリスクを伴い、疾患進行が移植後に継続することがあるの

で、衰退しつつある。ジフルニサルおよびタファミジスなどの小分子安定化剤はＡＴＴＲの進行を緩慢化させるようであるが、これらの剤は疾患進行を停止させない。

【００１０】

破壊のためにアミロイド原線維を標的化する短鎖干渉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また現在研究されているが、ＴＴＲ発現の短期の抑制に関する結果は希望的な予備データを示す一方、ＴＴＲの長期持続性の抑制を生成できる治療の必要性が存在する。

【００１１】

したがって、以下の実施形態が提供される。一部の実施形態では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓシステムなどのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ　ＤＮＡ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）と共にガイドＲＮＡを使用してＴＴＲ遺伝子の発現を実質的に低減させまたはノックアウトし、それにより、ＡＴＴＲと関連付けられるＴＴＲタンパク質の産生を実質的に低減させまたは除去する組成物および方法を提供する。ＴＴＲ遺伝子の変化を通じたＡＴＴＲと関連付けられるＴＴＲタンパク質の産生の実質的な低減または除去は、長期の低減または除去であり得る。

【発明の概要】

【００１２】

実施形態１：ＴＴＲ遺伝子内の二本鎖切断（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、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列を含むガイドＲＮＡ；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチドを含むガイドＲＮＡ；または

ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列を含むガイドＲＮＡ

を含む、

方法。

【００１３】

実施形態２：ＴＴＲ遺伝子を改変する方法であって、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結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡが、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または

ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列

を含む、

方法。

【００１４】

実施形態３：ＴＴＲと関連付けられるアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）を治療する方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、ＡＴＴＲを治療することを含み、組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡが、

ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；

ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または

ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列

を含む、

方法。

【００１５】
実施形態４：ＴＴＲの血清濃度を低減させる方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、ＴＴＲの血清濃度を低減させることを含み、組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列
を含む、
方法。
【００１６】
実施形態５：対象においてＴＴＲを含むアミロイドまたはアミロイド原線維の蓄積を低減させまたは予防する方法であって、組成物をそれを必要とする対象に投与し、それにより、アミロイドまたはアミロイド原線維の蓄積を低減させることを含み、組成物が、（ｉ）ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸および（ｉｉ）ガイドＲＮＡを含み、ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％、もしくは９０％同一のガイド配列
を含む、
方法。
【００１７】
実施形態６：ガイドＲＮＡを含む組成物であって、ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％同一のガイド配列
を含む、
組成物。
【００１８】
実施形態７：ガイドＲＮＡをコードするベクターを含む組成物であって、ガイドＲＮＡが、
ａ．配列番号：５～８２から選択されるガイド配列；
ｂ．配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０の連続するヌクレオチド；または
ｃ．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％同一のガイド配列
を含む、
組成物。
【００１９】
実施形態８：細胞または対象におけるＴＴＲ遺伝子内の二本鎖切断（ＤＳＢ）の誘導において使用するための、実施形態６または７の組成物。
【００２０】
実施形態９：細胞または対象におけるＴＴＲ遺伝子の改変において使用するための、実施形態６または７の組成物。

【００２１】
実施形態１０：対象におけるＴＴＲと関連付けられるアミロイドーシス（ＡＴＴＲ）の治療において使用するための、実施形態６または７の組成物。
【００２２】
実施形態１１：対象におけるＴＴＲの血清濃度の低減において使用するための、実施形態６または７の組成物。
【００２３】
実施形態１２：対象におけるアミロイドまたはアミロイド原線維の蓄積の低減または予防において使用するための、実施形態６または７の組成物。
【００２４】
実施形態１３：組成物が血清ＴＴＲレベルを低減させる、実施形態１～５のいずれか１つの方法または実施形態８～１２のいずれか１つの使用のための組成物。
【００２５】
実施形態１４：血清ＴＴＲレベルが、組成物の投与前の血清ＴＴＲレベルと比較して少なくとも５０％低減される、実施形態１３の方法または使用のための組成物。
【００２６】
実施形態１５：血清ＴＴＲレベルが、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％、または９９～１００％低減される、実施形態１３の方法または使用のための組成物。
【００２７】
実施形態１６：組成物がＴＴＲ遺伝子の編集を結果としてもたらす、実施形態１～５または８～１５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００２８】
実施形態１７：編集が、編集される集団のパーセンテージ（編集パーセント）として算出される、実施形態１６の方法または使用のための組成物。
【００２９】
実施形態１８：編集パーセントが集団の３０～９９％である、実施形態１７の方法または使用のための組成物。
【００３０】
実施形態１９：編集パーセントが、集団の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１７の方法または使用のための組成物。
【００３１】
実施形態２０：組成物が少なくとも１つの組織においてアミロイド沈着を低減させる、実施形態１～５のいずれか１つの方法または実施形態８～１９のいずれか１つの使用のための組成物。
【００３２】
実施形態２１：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１つまたは複数を含む、実施形態２０の方法または使用のための組成物。
【００３３】
実施形態２２：アミロイド沈着が、組成物の投与の８週後に測定される、実施形態２０または２１の方法または使用のための組成物。
【００３４】
実施形態２３：アミロイド沈着が、陰性対照または組成物の投与の前に測定されたレベルと比較される、実施形態２０～２２のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００３５】
実施形態２４：アミロイド沈着が、生検試料中でおよび／または免疫染色により測定される、実施形態２０～２３のいずれか１つの方法または使用のための組成物。

【００３６】
実施形態２５：アミロイド沈着が、陰性対照において見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％だけ低減される、実施形態２０～２４のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００３７】
実施形態２６：アミロイド沈着が、組成物の投与の前に見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％だけ低減される、実施形態２０～２５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００３８】
実施形態２７：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１～５または８～２６のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００３９】
実施形態２８：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２７の方法または使用のための組成物。
【００４０】
実施形態２９：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２７の方法または使用のための組成物。
【００４１】
実施形態３０：組成物が、最大で５、６、７、８、９、または１０回投与または送達される、実施形態２７の方法または使用のための組成物。
【００４２】
実施形態３１：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日の間隔で行われる、実施形態２７～３０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００４３】
実施形態３２：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週の間隔で行われる、実施形態２７～３０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００４４】
実施形態３３：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か月の間隔で行われる、実施形態２７～３０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００４５】
実施形態３４：ガイド配列が配列番号：５～８２から選択される、実施形態１～３３のいずれか１つの方法または組成物。
【００４６】
実施形態３５：ガイドＲＮＡが、ヒトＴＴＲ遺伝子中に存在する標的配列に少なくとも部分的に相補的である、実施形態１～３４のいずれか１つの方法または組成物。
【００４７】
実施形態３６：標的配列が、ヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン１、２、３、または４にある、実施形態３５の方法または組成物。
【００４８】
実施形態３７：標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン１にある、実施形態３５の方法または組成物。
【００４９】
実施形態３８：標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン２にある、実施形態３５の方法ま

たは組成物。
【００５０】
実施形態３９：標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン３にある、実施形態３５の方法または組成物。
【００５１】
実施形態４０：標的配列がヒトＴＴＲ遺伝子のエクソン４にある、実施形態３５の方法または組成物。
【００５２】
実施形態４１：ガイド配列がＴＴＲの正鎖中の標的配列に相補的である、実施形態１～４０のいずれか１つの方法または組成物。
【００５３】
実施形態４２：ガイド配列がＴＴＲの負鎖中の標的配列に相補的である、実施形態１～４０のいずれか１つの方法または組成物。
【００５４】
実施形態４３：第１のガイド配列がＴＴＲ遺伝子の正鎖中の第１の標的配列に相補的であり、かつ、組成物が、ＴＴＲ遺伝子の負鎖中の第２の標的配列に相補的な第２のガイド配列をさらに含む、実施形態１～４０のいずれか１つの方法または組成物。
【００５５】
実施形態４４：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’末端において後続する、実施形態１～４３のいずれか１つの方法または組成物。
【００５６】
実施形態４５：ガイドＲＮＡがデュアルガイド（ｄｇＲＮＡ）である、実施形態１～４４のいずれか１つの方法または組成物。
【００５７】
実施形態４６：デュアルガイドＲＮＡが、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを含み、ｃｒＲＮＡ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’末端において後続する、実施形態４５の方法または組成物。
【００５８】
実施形態４７：ガイドＲＮＡがシングルガイド（ｓｇＲＮＡ）である、実施形態１～４３のいずれか１つの方法または組成物。
【００５９】
実施形態４８：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４７の方法または組成物。
【００６０】
実施形態４９：ｓｇＲＮＡが配列番号：３の配列を含む、実施形態４７の方法または組成物。
【００６１】
実施形態５０：配列番号：３における各Ｎが任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎがガイド配列を形成し、かつ、ガイド配列がＣａｓ９をＴＴＲ遺伝子に標的化する、実施形態４８または４９の方法または組成物。
【００６２】
実施形態５１：ｓｇＲＮＡが、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つおよび配列番号：１２６のヌクレオチドを含む、実施形態４７～５０のいずれか１つの方法または組成物。
【００６３】
実施形態５２：ｓｇＲＮＡが、配列番号：８７～１２４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％同一のガイド配列を含む、実施形態４７～５１のいずれか１つの方法または組成物。
【００６４】

実施形態５３：ｓｇＲＮＡが、配列番号：８７～１２４から選択される配列を含む、実施形態４７の方法または組成物。
【００６５】
実施形態５４：ガイドＲＮＡが少なくとも１つの修飾を含む、実施形態１～５３のいずれか１つの方法または組成物。
【００６６】
実施形態５５：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５４の方法または組成物。
【００６７】
実施形態５６：少なくとも１つの修飾が、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、実施形態５４または５５の方法または組成物。
【００６８】
実施形態５７：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５４～５６のいずれか１つの方法または組成物。
【００６９】
実施形態５８：少なくとも１つの修飾が、５’末端における最初の５つのヌクレオチドの１つまたは複数における修飾を含む、実施形態５４～５７のいずれか１つの方法または組成物。
【００７０】
実施形態５９：少なくとも１つの修飾が、３’末端における最後の５つのヌクレオチドの１つまたは複数における修飾を含む、実施形態５４～５８のいずれか１つの方法または組成物。
【００７１】
実施形態６０：少なくとも１つの修飾が、最初の４つのヌクレオチドの間のＰＳ結合を含む、実施形態５４～５９のいずれか１つの方法または組成物。
【００７２】
実施形態６１：少なくとも１つの修飾が、最後の４つのヌクレオチドの間のＰＳ結合を含む、実施形態５４～６０のいずれか１つの方法または組成物。
【００７３】
実施形態６２：少なくとも１つの修飾が、５’末端における最初の３つ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、実施形態５４～６１のいずれか１つの方法または組成物。
【００７４】
実施形態６３：少なくとも１つの修飾が、３’末端における最後の３つ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、実施形態５４～６２のいずれか１つの方法または組成物。
【００７５】
実施形態６４：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５４～６３のいずれか１つの方法または組成物。
【００７６】
実施形態６５：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１～６４のいずれか１つの方法または組成物。
【００７７】
実施形態６６：ガイドＲＮＡが脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、実施形態１～６５のいずれか１つの方法または組成物。
【００７８】
実施形態６７：ＬＮＰがＣＣＤ脂質を含む、実施形態６６の方法または組成物。
【００７９】
実施形態６８：ＣＣＤ脂質がリピドａまたはリピドＢである、実施形態６７の方法または組成物。

【００８０】
実施形態６９：ＬＮＰが中性脂質を含む、実施形態６６～６８の方法または組成物。
【００８１】
実施形態７０：中性脂質がＤＳＰＣである、実施形態６９の方法または組成物。
【００８２】
実施形態７１：ＬＮＰがヘルパー脂質を含む、実施形態６６～７０のいずれか１つの方法または組成物。
【００８３】
実施形態７２：ヘルパー脂質がコレステロールである、実施形態７１の方法または組成物。
【００８４】
実施形態７３：ＬＮＰがステルス脂質を含む、実施形態６６～７２のいずれか１つの方法または組成物。
【００８５】
実施形態７４：ステルス脂質がＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、実施形態７３の方法または組成物。
【００８６】
実施形態７５：組成物がＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をさらに含む、実施形態１～７４のいずれか１つの方法または組成物。
【００８７】
実施形態７６：組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡをさらに含む、実施形態１～７５のいずれか１つの方法または組成物。
【００８８】
実施形態７７：ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がＣａｓクリベースである、実施形態７５または７６の方法または組成物。
【００８９】
実施形態７８：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。
【００９０】
実施形態７９：ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が修飾されている、実施形態７５～７８のいずれか１つの方法または組成物。
【００９１】
実施形態８０：ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がニッカーゼである、実施形態７５～７９のいずれか１つの方法または組成物。
【００９２】
実施形態８１：修飾されているＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が核局在シグナル（ＮＬＳ）を含む、実施形態７９または８０の方法または組成物。
【００９３】
実施形態８２：ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからの Ｃａｓである、実施形態７５～８１のいずれか１つの方法または組成物。
【００９４】
実施形態８３：組成物が医薬配合物であり、かつ薬学的に許容される担体をさらに含む、実施形態１～８２のいずれか１つの方法または組成物。
【００９５】
実施形態８４：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させまたは予防する、実施形態１～５または８～８３のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００９６】
実施形態８５：アミロイドまたはアミロイド原線維が、神経、心臓、または胃腸管（ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｔｒａｃｋ）にある、実施形態８４の方法または使用の

ための組成物。
【００９７】
実施形態８６：非相同末端結合（ＮＨＥＪ）が、ＴＴＲ遺伝子におけるＤＳＢの修復の間に突然変異をもたらす、実施形態１～５または８～８３のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【００９８】
実施形態８７：ＮＨＥＪが、ＴＴＲ遺伝子におけるＤＳＢの修復の間にヌクレオチドの欠失または挿入をもたらす、実施形態８６の方法または使用のための組成物。
【００９９】
実施形態８８：ヌクレオチドの欠失または挿入が、ＴＴＲ遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス突然変異を誘導する、実施形態８７の方法または使用のための組成物。
【０１００】
実施形態８９：フレームシフトまたはナンセンス突然変異が、少なくとも５０％の肝細胞のＴＴＲ遺伝子において誘導される、実施形態８７の方法または使用のための組成物。
【０１０１】
実施形態９０：フレームシフトまたはナンセンス突然変異が、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％または８０％、８０％～９０％、９０～９５％、９５％～９９％、または９９％～１００％の肝細胞のＴＴＲ遺伝子において誘導される、実施形態８９の方法または使用のための組成物。
【０１０２】
実施形態９１：ヌクレオチドの欠失または挿入が、オフターゲット部位におけるよりも少なくとも５０倍またはより多くＴＴＲ遺伝子において起こる、実施形態８７～９０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１０３】
実施形態９２：ヌクレオチドの欠失または挿入が、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ＴＴＲ遺伝子において起こる、実施形態９１の方法または使用のための組成物。
【０１０４】
実施形態９３：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、２、１、もしくは０未満または３、２、１、もしくは０に等しいオフターゲット部位において起こり、任意選択的に、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、実施形態８７～９２のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１０５】
実施形態９４：ヌクレオチドの欠失または挿入が、Ｃａｓ９過剰発現細胞においてヌクレオチドの欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数より少ない初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数で起こり、任意選択的に、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、実施形態９３の方法または使用のための組成物。
【０１０６】
実施形態９５：Ｃａｓ９過剰発現細胞が、Ｃａｓ９を安定的に発現するＨＥＫ２９３細胞である、実施形態９４の方法または使用のための組成物。
【０１０７】
実施形態９６：初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解析することにより決定され、任意選択的に、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、実施形態９３～９５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。

【０１０８】
実施形態９７：初代ヒト肝細胞におけるオフターゲット部位の数が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣａｓ９　ｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、およびドナーオリゴヌクレオチドをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解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り決定され、任意選択的に、オフターゲット部位が、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こらない、実施形態９３～９５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１０９】
実施形態９８：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、任意選択的に、ガイドＲＮＡが、初代ヒト肝細胞のゲノムにおけるタンパク質コーディング領域において起こるオフターゲット部位においてインデルを生成しない、実施形態１～４３または４７～９７のいずれか１つの方法または組成物。
【０１１０】
実施形態９９：組成物を投与することが、対象においてＴＴＲのレベルを低減させる、実施形態１～５または８～９８のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１１１】
実施形態１００：ＴＴＲのレベルが少なくとも５０％低減される、実施形態９９の方法または使用のための組成物。
【０１１２】
実施形態１０１：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％低減される、実施形態１００の方法または使用のための組成物。
【０１１３】
実施形態１０２：ＴＴＲのレベルが、血清、血漿、血液、脳脊髄液、または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。
【０１１４】
実施形態１０３：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。
【０１１５】
実施形態１０４：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。
【０１１６】
実施形態１０５：対象がＡＴＴＲを有する、実施形態１～５または８～１０４のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１１７】
実施形態１０６：対象がヒトである、実施形態１～５または８～１０５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１１８】
実施形態１０７：対象がＡＴＴＲｗｔ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。
【０１１９】
実施形態１０８：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。
【０１２０】
実施形態１０９：対象がＡＴＴＲの家族歴を有する、実施形態１～５、８～１０６、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。
【０１２１】
実施形態１１０：対象が家族性アミロイド多発ニューロパチーを有する、実施形態１～５、８～１０６、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。
【０１２２】
実施形態１１１：対象が、ＡＴＴＲの神経症状のみを有するか、または主にＡＴＴＲの神経症状を有する、実施形態１～５または８～１１０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１２３】
実施形態１１２：対象が家族性アミロイド心筋症を有する、実施形態１～５または８～１１０のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１２４】
実施形態１１３：対象が、ＡＴＴＲの心臓症状のみを有するか、または主にＡＴＴＲの心臓症状を有する、実施形態１～５、８～１０９、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。
【０１２５】
実施形態１１４：対象が、Ｖ３０突然変異を有するＴＴＲを発現する、実施形態１～５または８～１１３のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１２６】
実施形態１１５：Ｖ３０突然変異が、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。
【０１２７】
実施形態１１６：対象が、Ｔ６０突然変異を有するＴＴＲを発現する、実施形態１～５または８～１１３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。
【０１２８】
実施形態１１７：Ｔ６０突然変異がＴ６０Ａである、実施形態１１６の方法または使用のための組成物。
【０１２９】
実施形態１１８：対象が、Ｖ１２２突然変異を有するＴＴＲを発現する、実施形態１～５または８～１１３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。
【０１３０】
実施形態１１９：Ｖ１２２突然変異が、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。
【０１３１】
実施形態１２０：対象が野生型ＴＴＲを発現する、実施形態１～５または８～１１９のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１３２】
実施形態１２１：対象が、Ｖ３０、Ｔ６０、またはＶ１２２突然変異を有するＴＴＲを発現しない、実施形態１～５、８～１０７、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。
【０１３３】
実施形態１２２：対象が、病理学的突然変異を有するＴＴＲを発現しない、実施形態１～５、８～１０７、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。
【０１３４】
実施形態１２３：対象が野生型ＴＴＲについてホモ接合である、実施形態１２１の方法または使用のための組成物。
【０１３５】
実施形態１２４：投与後に対象が、感覚運動性ニューロパチーの症状における改善、安定化、または変化の緩慢化を有する、実施形態１～５または８～１２３のいずれか１つの方

法または使用のための組成物。
【０１３６】
実施形態１２５：感覚性ニューロパチーにおける改善、安定化、または変化の緩慢化が、筋電図、神経伝導検査、または患者報告アウトカム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。
【０１３７】
実施形態１２６：対象が、鬱血性心不全の症状における改善、安定化、または変化の緩慢化を有する、実施形態１～５または８～１２５のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１３８】
実施形態１２７：鬱血性心不全における改善、安定化、または変化の緩慢化が、心臓バイオマーカー検査、肺機能検査、胸部Ｘ線、または心電図記録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。
【０１３９】
実施形態１２８：組成物または医薬配合物がウイルスベクターを介して投与される、実施形態１～５または８～１２７のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１４０】
実施形態１２９：組成物または医薬配合物が脂質ナノ粒子を介して投与される、実施形態１～５または８～１２７のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１４１】
実施形態１３０：対象が、組成物または配合物を投与する前にＴＴＲ遺伝子における特定の突然変異について試験される、実施形態１～５または８～１２９のいずれか１つの方法または使用のための組成物。
【０１４２】
実施形態１３１：配列番号：５～８２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。
【０１４３】
実施形態１３２：配列番号：５～８２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。
【０１４４】
実施形態１３３：配列番号：５～８２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。
【０１４５】
実施形態１３４：配列番号：５～８２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。
【０１４６】
実施形態１３５：配列番号：５～８２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。
【０１４７】
実施形態１３６：配列番号：５～８２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。
【０１４８】
実施形態１３７：配列番号：５～８２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。
【０１４９】
実施形態１３８：配列番号：５～８２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。
【０１５０】
実施形態１３９：配列番号：５～８２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。

【０１５１】
実施形態１４０：配列番号：５～８２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。
【０１５２】
実施形態１４１：配列番号：５～８２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。
【０１５３】
実施形態１４２：配列番号：５～８２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。
【０１５４】
実施形態１４３：配列番号：５～８２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。
【０１５５】
実施形態１４４：配列番号：５～８２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。
【０１５６】
実施形態１４５：配列番号：５～８２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。
【０１５７】
実施形態１４６：配列番号：５～８２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。
【０１５８】
実施形態１４７：配列番号：５～８２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。
【０１５９】
実施形態１４８：配列番号：５～８２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。
【０１６０】
実施形態１４９：配列番号：５～８２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。
【０１６１】
実施形態１５０：配列番号：５～８２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。
【０１６２】
実施形態１５１：配列番号：５～８２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。
【０１６３】
実施形態１５２：配列番号：５～８２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。
【０１６４】
実施形態１５３：配列番号：５～８２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。
【０１６５】
実施形態１５４：配列番号：５～８２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。
【０１６６】
実施形態１５５：配列番号：５～８２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。
【０１６７】
実施形態１５６：配列番号：５～８２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。
【０１６８】
実施形態１５７：配列番号：５～８２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。
【０１６９】
実施形態１５８：配列番号：５～８２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。
【０１７０】
実施形態１５９：配列番号：５～８２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。
【０１７１】
実施形態１６０：配列番号：５～８２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。
【０１７２】
実施形態１６１：配列番号：５～８２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。
【０１７３】
実施形態１６２：配列番号：５～８２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。
【０１７４】
実施形態１６３：配列番号：５～８２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。
【０１７５】
実施形態１６４：配列番号：５～８２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。
【０１７６】
実施形態１６５：配列番号：５～８２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。
【０１７７】
実施形態１６６：配列番号：５～８２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。
【０１７８】
実施形態１６７：配列番号：５～８２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。
【０１７９】
実施形態１６８：配列番号：５～８２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。
【０１８０】
実施形態１６９：配列番号：５～８２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。
【０１８１】
実施形態１７０：配列番号：５～８２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。
【０１８２】
実施形態１７１：配列番号：５～８２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。
【０１８３】
実施形態１７２：配列番号：５～８２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。
【０１８４】

実施形態１７３：配列番号：５～８２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。

【０１８５】

実施形態１７４：配列番号：５～８２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。

【０１８６】

実施形態１７５：配列番号：５～８２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。

【０１８７】

実施形態１７６：配列番号：５～８２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。

【０１８８】

実施形態１７７：配列番号：５～８２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。

【０１８９】

実施形態１７８：配列番号：５～８２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。

【０１９０】

実施形態１７９：配列番号：５～８２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。

【０１９１】

実施形態１８０：配列番号：５～８２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。

【０１９２】

実施形態１８１：配列番号：５～８２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。

【０１９３】

実施形態１８２：配列番号：５～８２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。

【０１９４】

実施形態１８３：配列番号：５～８２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。

【０１９５】

実施形態１８４：配列番号：５～８２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。

【０１９６】

実施形態１８５：配列番号：５～８２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。

【０１９７】

実施形態１８６：配列番号：５～８２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。

【０１９８】

実施形態１８７：配列番号：５～８２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。

【０１９９】

実施形態１８８：配列番号：５～８２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。

【０２００】

実施形態１８９：配列番号：５～８２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。

【０２０１】
実施形態１９０：配列番号：５～８２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。
【０２０２】
実施形態１９１：配列番号：５～８２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。
【０２０３】
実施形態１９２：配列番号：５～８２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。
【０２０４】
実施形態１９３：配列番号：５～８２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。
【０２０５】
実施形態１９４：配列番号：５～８２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。
【０２０６】
実施形態１９５：配列番号：５～８２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。
【０２０７】
実施形態１９６：配列番号：５～８２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。
【０２０８】
実施形態１９７：配列番号：５～８２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。
【０２０９】
実施形態１９８：配列番号：５～８２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。
【０２１０】
実施形態１９９：配列番号：５～８２から選択される配列が配列番号：７３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。
【０２１１】
実施形態２００：配列番号：５～８２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。
【０２１２】
実施形態２０１：配列番号：５～８２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。
【０２１３】
実施形態２０２：配列番号：５～８２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。
【０２１４】
実施形態２０３：配列番号：５～８２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。
【０２１５】
実施形態２０４：配列番号：５～８２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。
【０２１６】
実施形態２０５：配列番号：５～８２から選択される配列が配列番号：７９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。
【０２１７】
実施形態２０６：配列番号：５～８２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。
【０２１８】
実施形態２０７：配列番号：５～８２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。
【０２１９】
実施形態２０８：配列番号：５～８２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。
【０２２０】
実施形態２０９：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６～２０８のいずれかの組成物または配合物の使用。
【０２２１】
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、先行する実施形態のいずれかの組成物または配合物の使用もまた開示される。ＡＴＴＲの治療において使用するためまたはＴＴＲ遺伝子の改変（例えば、ＴＴＲ遺伝子におけるインデルの形成、もしくはフレームシフトもしくはナンセンス突然変異の形成）において使用するための、先行する組成物または配合物のいずれかもまた開示される。
【図面の簡単な説明】
【０２２２】
【図１】図１は、表１に提供されるガイド配列により標的化されるＴＴＲ遺伝子の領域を有する第１８染色体の構成図を示す。
【図２】図２は、ＴＴＲを標的化するある特定のデュアルガイドＲＮＡのＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞におけるオフターゲット解析を示す。試験した各デュアルガイドＲＮＡについてオンターゲット部位を黒四角により示す一方、黒丸は潜在的なオフターゲット部位を表す。
【図３】図３は、ＴＴＲを標的化するある特定のシングルガイドＲＮＡのＨＥＫ＿Ｃａｓ９細胞におけるオフターゲット解析を示す。試験した各シングルガイドＲＮＡについてオンターゲット部位を黒四角により示す一方、白丸は潜在的なオフターゲット部位を表す。
【図４】図４は、初代ヒト肝細胞における脂質ナノ粒子配合ヒトＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図５】図５は、初代カニクイザル（ｃｙｎｏ）肝細胞における脂質ナノ粒子配合ヒトＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図６】図６は、初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子配合カニクイザルＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図７】図７は、ｘ軸に提供されるガイド配列のＨＵＨ７細胞における投与後のＴＴＲの編集パーセント（編集％）および分泌されるＴＴＲの低減を示す。値は、アルファ－１－アンチトリプシン（ＡＡＴ）タンパク質の量に対して正規化している。
【図８】図８は、ＨＵＨ７細胞における標的化されるガイド（表１に列記する）の投与後の細胞内ＴＴＲのウエスタンブロット解析を示す。
【図９】図９は、ヒト化（Ｇ４８１～Ｇ４９９）またはマウス（Ｇ２８２）ＴＴＲを有するマウスへのＬＮＰ配合物の投与後に観察されたＴＴＲの肝臓編集パーセンテージを示す。注記：各ガイドＩＤにおける最初の３つの「０」は図から省略しており、例えば「Ｇ４８１」は表２および表３における「Ｇ０００４８１」である。
【図１０Ａ】図１０Ａ～Ｂは、水平軸に指し示す投与レジメン後に観察された血清ＴＴＲレベルをμｇ／ｍｌ（図１０Ａ）またはＴＳＳ対照のパーセンテージ（図１０Ｂ）として示す。全体を通じてＭＰＫ＝ｍｇ／ｋｇ。
【図１０Ｂ】同上。
【図１１Ａ】図１１Ａ～Ｂは、１ｍｇ／ｋｇ（図１１Ａ）または０．５ｍｇ／ｋｇの投与量（図１１Ｂ）について水平軸に指し示す投与レジメン後に観察された血清ＴＴＲレベルを示す。単回の２ｍｇ／ｋｇ用量についてのデータを両方のパネル中の右列として含めている。

【図１１Ｂ】同上。
【図１２Ａ】図１２Ａ～Ｂは、１ｍｇ／ｋｇ（図１２Ａ）または０．５ｍｇ／ｋｇの投与量（図１２Ｂ）について水平軸に指し示す投与レジメン後に観察された肝臓編集パーセンテージを示す。図１２Ｃは、０．５、１、または２ｍｇ／ｋｇでの単回用量後に観察された肝臓編集パーセンテージを示す。
【図１２Ｂ】同上。
【図１２Ｃ】同上。
【図１３】図１３は、ＴＴＲ遺伝子に関してヒト化されたマウスへのＬＮＰ配合物の投与後に観察された肝臓編集パーセントを示す。注記：各ガイドＩＤにおける最初の３つの「０」は図から省略しており、例えば「Ｇ４８１」は表２および表３における「Ｇ０００４８１」である。
【図１４Ａ】図１４Ａ～Ｂは、ＴＴＲ遺伝子に関してヒト化されたマウスへのＬＮＰ配合物の投与後の肝臓編集（図１４Ａ）と血清ヒトＴＴＲレベル（図１４Ｂ）との間に相関があることを示す。注記：各ガイドＩＤにおける最初の３つの「０」は図から省略しており、例えば「Ｇ４８１」は表２および表３における「Ｇ０００４８１」である。
【図１４Ｂ】同上。
【図１５Ａ】図１５Ａ～Ｂは、マウスとカニクイザルとの間で交差相同性であるガイドＧ５０２を含むＬＮＰ配合物の投与後の野生型マウスにおいて編集パーセント（図１５Ａ）および血清ＴＴＲレベル（図１５Ｂ）に関して用量応答があることを示す。
【図１５Ｂ】同上。
【図１６】図１６は、初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子配合ヒトＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図１７】図１７は、初代ヒト肝細胞における脂質ナノ粒子配合カニクイザルＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図１８】図１８は、初代カニクイザル肝細胞における脂質ナノ粒子配合カニクイザルＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡの用量応答曲線を示す。
【図１９Ａ】図１９Ａ～Ｄは、指し示す比および量でのＬＮＰ配合物の投与後の血清ＴＴＲ（ＴＳＳの％；図１９Ａおよび図１９Ｃ）および編集の結果（図１９Ｂおよび図１９Ｄ）を示す。
【図１９Ｂ】同上。
【図１９Ｃ】同上。
【図１９Ｄ】同上。
【図２０】図２０は、ＴＴＲを標的化する初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるある特定のシングルガイドＲＮＡのオフターゲット解析を示す。グラフ中、黒四角はオンターゲット切断部位の同定を表し、白丸は潜在的なオフターゲット部位の同定を表す。
【図２１Ａ】図２１Ａ～Ｂは、脂質ナノ粒子配合Ｇ０００４８０の投与後の初代ヒト肝細胞におけるオンターゲット（ＯＮＴ、図２１Ａ）および２つのオフターゲット部位（ＯＴ２およびＯＴ４）における編集パーセントを示す。図２１Ｂは、図２１ＡにおけるＯＴ２、ＯＴ４、および陰性対照データの再縮尺バージョンである。
【図２１Ｂ】同上。
【図２２Ａ】図２２Ａ～Ｂは、脂質ナノ粒子配合Ｇ０００４８６の投与後の初代ヒト肝細胞におけるオンターゲット（ＯＮＴ、図２２Ａ）およびオフターゲット部位（ＯＴ４）における編集パーセントを示す。図２２Ｂは、図２２ＡにおけるＯＴ４および陰性対照データの再縮尺バージョンである。
【図２２Ｂ】同上。
【図２３Ａ】図２３Ａ～Ｂは、ＴＴＲ遺伝子座における編集パーセント（図２３Ａ）ならびに挿入および欠失事象の数（図２３Ｂ）を示す。図２３Ａは、対照および処置（脂質ナノ粒子配合ＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡを投与）群におけるＴＴＲ遺伝子座における編集パーセントを示す。図２３Ｂは、編集が図２３Ａの処置群において観察された場合のＴＴＲ遺伝子座における挿入および欠失事象の数を示す。

【図２３Ｂ】同上。
【図２４Ａ】図２４Ａ～Ｂは、対照および処置（脂質ナノ粒子配合ＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡを投与）群についてのそれぞれ循環血清（図２４Ａ）および脳脊髄液（ＣＳＦ）（図２４Ｂ）中のＴＴＲレベル（μｇ／ｍＬ）を示す。処置は、血清中のＴＴＲレベルの＞９９％のノックダウンを結果としてもたらした。
【図２４Ｂ】同上。
【図２５Ａ】図２５Ａ～Ｄは、対照および処置（脂質ナノ粒子配合ＴＴＲ特異的ｓｇＲＮＡを投与）マウスからの胃（図２５Ａ）、結腸（図２５Ｂ）、坐骨神経（図２５Ｃ）、および後根神経節（ＤＲＧ）（図２５Ｄ）におけるＴＴＲについての染色を伴う免疫組織化学画像を示す。右の棒グラフは、各組織種について占有面積のパーセントにより測定される処置マウスにおける処置の８週後のＴＴＲ染色の低減を示す。
【図２５Ｂ】同上。
【図２５Ｃ】同上。
【図２５Ｄ】同上。
【図２６Ａ】図２６Ａ～Ｃは、ガイドＧ０００４８０、Ｇ０００４８８、Ｇ０００４８９およびＧ０００５０２を有しかつガイドに対して１：１の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有する、用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与されたヒト化ＴＴＲマウスからの、それぞれ肝臓ＴＴＲ編集（図２６Ａ）および血清ＴＴＲの結果（μｇ／ｍＬ（図２６Ｂ）およびＴＳＳ処置対照のパーセンテージ（図２６Ｃ））を示す。
【図２６Ｂ】同上。
【図２６Ｃ】同上。
【図２７Ａ】図２７Ａ～Ｃは、ガイドＧ０００４８１、Ｇ０００４８２、Ｇ０００４８６およびＧ０００４９９を有しかつガイドに対して１：１の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有する、用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与されたヒト化ＴＴＲマウスからの、それぞれ肝臓ＴＴＲ編集（図２７Ａ）および血清ＴＴＲの結果（μｇ／ｍＬ（図２７Ｂ）およびＴＳＳ処置対照のパーセンテージ（図２７Ｃ））を示す。
【図２７Ｂ】同上。
【図２７Ｃ】同上。
【図２８Ａ】図２８Ａ～Ｃは、ガイドＧ０００４８０、Ｇ０００４８１、Ｇ０００４８６、Ｇ０００４９９およびＧ０００５０２を有しかつガイドに対して１：２の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有する、用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与されたヒト化ＴＴＲマウスからの、それぞれ肝臓ＴＴＲ編集（図２８Ａ）および血清ＴＴＲの結果（μｇ／ｍＬ（図２８Ｂ）およびＴＳＳ処置対照のパーセンテージ（図２８Ｃ））を示す。
【図２８Ｂ】同上。
【図２８Ｃ】同上。
【図２９】図２９は、陰性（非処理）対照と比較した、指し示すようにＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含むＬＮＰを用いた処理後の初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を示す。
【図３０】図３０は、陰性（非処理）対照と比較した、指し示すようにＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含むＬＮＰを用いた処理後の初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を示す。
【発明を実施するための形態】
【０２２３】
添付の図面にその例を示す本発明のある特定の実施形態に関してこれより詳細に言及する。示した実施形態と組み合わせて本発明を記載するが、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しないことが理解されるであろう。反対に、本発明は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明に含まれ得る全ての代替物、修飾、および均等物をカバーすることが意図される。
【０２２４】

本教示を詳細に記載する前に、本開示は、特定の組成物または方法ステップに限定されず、変更されてもよいことが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において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、文脈が明らかにそうでないことを規定しなければ、複数への言及を含むことが留意されるべきである。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。

【０２２５】

数値範囲は、該範囲を定義する数を含む。測定値および測定可能値は、測定と関連付けられる有効数字および誤差を考慮に入れて、おおよそのものであることが理解される。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、限定的であることが意図されない。以上の概要および詳細な説明の両方は例示的で説明的なものに過ぎず、教示を制限するものではないことが理解されるべきである。

【０２２６】

上記の規定において特に記載されなければ、様々な成分を「含む」ことを記載する本明細書中の実施形態はまた、記載された成分「からなる」または「から本質的になる」ものとして想定され、様々な成分「からなる」ことを記載する本明細書中の実施形態はまた、記載された成分を「含む」または該成分「から本質的になる」ものとして想定され、様々な成分「から本質的になる」ことを記載する本明細書中の実施形態はまた、記載された成分「からなる」または該成分を「含む」ものとして想定される（この相互交換可能性は、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」という用語は包含的な意味で使用され、すなわち、文脈がそうでないことを明確に指し示さなければ、「および／または」と同等である。

【０２２７】

本明細書において使用されるセクションの見出しは、文書構成上の目的のものに過ぎず、いかなる意味でも所望の主題を限定するものとして解釈されるべきではない。参照することにより組み込まれる任意の材料が、本明細書において定義される任意の用語または本明細書の任意の他の表現内容と矛盾する場合、本明細書が優先される。本教示は様々な実施形態と組み合わせて記載されるが、本教示がそのような実施形態に限定されることは意図されない。反対に、本教示は、当業者により理解されるような、様々な代替物、修飾、および均等物を包含する。

【０２２８】

Ｉ．定義

別段の記載がなければ、本明細書において使用される以下の用語および語句は、以下の意味を有することが意図される。

【０２２９】

「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、骨格に沿って連結された含窒素複素環塩基または塩基アナログを有するヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログを含むマルチマー化合物を指すために本明細書において使用され、通常のＲＮＡ、ＤＮＡ、ＲＮＡ－ＤＮＡ混合物、およびこれらのアナログであるポリマーが含まれる。核酸「骨格」は、糖－ホスホジエステル結合、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、またはこれらの組合せの１つまたは複数などの様々な連結から構成されることができる。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’メトキシもしくは２’ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。含窒素塩基は、通常の塩基（Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ｕ）、これらのアナログ（例えば、修飾ウリジン、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、またはその他）；イノシ

ン；プリンまたはピリミジンの誘導体（例えば、$N^4$－メチルデオキシグアノシン、デアザまたはアザプリン、デアザまたはアザピリミジン、５位または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、または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、$O^6$－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$O^4$－アルキル－ピリミジン；米国特許第５，３７８，８２５号明細書およびＰＣＴ第ＷＯ９３／１３１２１号）であり得る。全般的議論についてＴｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ５－３６，Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，１１ｔｈ ｅｄ．，１９９２を参照。核酸は、骨格がポリマーの位置について含窒素塩基を含まない１つまたは複数の「脱塩基」残基を含むことができる（米国特許第５，５８５，４８１号明細書）。核酸は、通常のＲＮＡもしくはＤＮＡの糖、塩基および連結のみを含むことができ、または、通常の成分および置換の両方を含むことができる（例えば、２’メトキシ連結を有する通常の塩基、もしくは通常の塩基および１つもしくは複数の塩基アナログを含有するポリマー）。核酸は、「ロックド核酸」（ＬＮＡ）、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増進させる、糖構造を模倣するＲＮＡ中にロックされた二環式フラノース単位を有する１つまたは複数のＬＮＡヌクレオチド単量体を含有するアナログを含む（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におけるウラシルまたはそのアナログおよびＤＮＡにおけるチミンまたはそのアナログの存在により異なり得る。

【０２３０】

「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、および「ガイド」は、ｃｒＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡとしても公知）、またはｃｒＲＮＡとｔｒＲＮＡとの組合せ（ｔｒａｃｒＲＮＡとしても公知）のいずれかを指すために本明細書において交換可能に使用される。ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一のＲＮＡ分子（シングルガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）としてまたは２つの別々のＲＮＡ分子（デュアルガイドＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ）として会合することができる。「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変形を有するｔｒＲＮＡ配列であってもよい。

【０２３１】

本明細書において使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に相補的であり、かつ、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤による結合または修飾（例えば、切断）のためにガイドＲＮＡを標的配列に方向付けるように機能する、ガイドＲＮＡ内の配列を指す。「ガイド配列」はまた、「標的化配列」または「スペーサー配列」と称されることもある。ガイド配列は、例えば、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）（すなわち、Ｓｐｙ Ｃａｓ９）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。より短いまたはより長い配列もまたガイドとして使用することができ、該配列は例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチドの長さである。例えば、一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０の連続するヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、標的配列は、例えば、遺伝子中または染色体上にあり、ガイド配列に相補的である。一部の実施形態では、ガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約７５％、８０％、８５％、８８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であってもよい。例えば、一部の実施形態では、ガイド配列は、配列番号：５～８２から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０の連続するヌクレオチドと約７５％、８０％、８５％、８８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、ガイド配列および標的領域は、１００％相補的であるか、または同一であってもよい。他の実施形態では、ガイド配列および標的領域は、少なくとも１つのミスマッチを含有してもよい。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もよく、標的配列の全長は、少なくとも１７、１８、１９、２０またはより多くの塩基対である。一部の実施形態では、ガイド配列および標的領域は、１～４個のミスマッチを含有してもよく、ガイド配列は、少なくとも１７、１８、１９、２０またはより多くのヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド配列および標的領域は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有してもよく、ガイド配列は２０個のヌクレオチドを含む。

【０２３２】

Ｃａｓタンパク質の標的配列としては、Ｃａｓタンパク質の核酸基質は二本鎖核酸であるので、ゲノムＤＮＡの正鎖および負鎖の両方（すなわち、所与の配列および該配列の逆相補体）が挙げられる。したがって、ガイド配列が「標的配列に相補的である」と記載される場合、ガイド配列は、標的配列の逆相補鎖に結合するようにガイドＲＮＡを方向付けてもよいことが理解されるべきである。したがって、一部の実施形態では、ガイド配列が標的配列の逆相補鎖に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列中のＴについてのＵによる置換を除いて標的配列（例えば、ＰＡＭを含まない標的配列）のある特定のヌクレオチドと同一である。

【０２３３】

本明細書において使用される場合、「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またはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のＤＮＡ結合サブユニットであって、ＤＮＡ結合活性が配列特異的かつＲＮＡの配列に依存するものを意味する。例示的なＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤としては、Ｃａｓクリベース／ニッカーゼおよびその不活性化形態（「ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤」）が挙げられる。「Ｃａｓタンパク質」とも呼ばれる「Ｃａｓヌクレアーゼ」は、本明細書において使用される場合、Ｃａｓクリベース、Ｃａｓニッカーゼ、およびｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤を包含する。Ｃａｓクリベース／ニッカーゼおよびｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤としては、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣｓｍまたはＣｍｒ複合体、そのＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、またはＣｍｒ２サブユニット、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲシステムのカスケード複合体、そのＣａｓ３サブユニット、およびクラス２　Ｃａｓヌクレアーゼが挙げられる。本明細書において使用される場合、「クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼ」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合活性を有する一本鎖ポリペプチド、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはＣｐｆ１ヌクレアーゼである。クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼとしては、ＲＮＡガイドＤＮＡクリベースまたはニッカーゼ活性をさらに有するクラス２　Ｃａｓクリベースおよびクラス２　Ｃａｓニッカーゼ（例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、またはＮ８６３Ａ変種）、およびクリベース／ニッカーゼ活性が不活性化されたクラス２　ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤が挙げられる。クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼとしては、例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、ＨＦ　Ｃａｓ９（例えば、Ｎ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｑ９２６Ａ変種）、ＨｙｐａＣａｓ９（例えば、Ｎ６９２Ａ、Ｍ６９４Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｈ６９８Ａ変種）、ｅＳＰＣａｓ９（１．０）（例えば、Ｋ８１０Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａ変種）、およびｅＳＰＣａｓ９（１．１）（例えば、Ｋ８４８Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａ変種）タンパク質およびこれらの改変が挙げられる。Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１６３：１－１３（２０１５）のＣｐｆ１タンパク質はＣａｓ９に相同的であり、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含有する。ＺｅｔｓｃｈｅのＣｐｆ１配列は参照することにより全体が組み込まれる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ、表Ｓ１および表Ｓ３を参照。「Ｃａｓ９」は、本明細書において列記されるＣａｓ９の変種であるＳｐｙ　Ｃａｓ９、およびその均等物を包含する。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。

【０２３４】

「修飾ウリジン」は、ウリジンと同じ水素結合受容体を有しかつウリジンからの１つまたは複数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本明細書におい

て使用される。一部の実施形態では、修飾ウリジンは置換ウリジン、すなわち、１つまたは複数の非プロトン置換基（例えば、アルコキシ、例えばメトキシ）がプロトンを置換するウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンはシュードウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは置換シュードウリジン、すなわち、１つまたは複数の非プロトン置換基（例えば、アルキル、例えばメチル）がプロトンを置換するシュードウリジンである。一部の実施形態では、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いずれかである。

【０２３５】

本明細書において使用される「ウリジン位置」は、ウリジンまたは修飾ウリジンにより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、同じ配列の通常のＲＮＡ（全ての塩基が、標準的なＡ、Ｕ、Ｃ、またはＧ塩基である）においてウリジンであるあらゆる位置において修飾ウリジンを含有する。そうでないことを指し示さなければ、本開示中の、または本開示に添付される配列表のポリヌクレオチド配列におけるＵは、ウリジンまたは修飾ウリジンであり得る。

【０２３６】

本明細書において使用される場合、第２の配列に対する第１の配列のアライメントが、第２の配列の全体のＸ％またはより多くの位置が第１の配列とマッチすることを示す場合に、第１の配列は第２の配列に対して「少なくともＸ％の同一性を有する配列を含む」と考えられる。例えば、配列ＡＡＧＡは配列ＡＡＧに対して１００％の同一性を有する配列を含み、その理由は、第２の配列の３つ全ての位置にマッチするという点でアライメントが１００％の同一性を与えるからである。ＲＮＡとＤＮＡとの差異（一般に、チミジンのウリジンによる交換またはその逆）および修飾ウリジンなどのヌクレオシドアナログの存在は、関連するヌクレオチド（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン）が同じ相補体を有する限り（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てについてアデノシン；別の例はシトシンおよび５－メチルシトシンであり、これらの両方は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）、ポリヌクレオチドの間の同一性または相補性の差異に寄与しない。したがって、例えば、配列５’－ＡＸＧ（Ｘは、任意の修飾ウリジン、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）はＡＵＧと１００％同一であると考えられ、これは、両方が同じ配列（５’－ＣＡＵ）に完全に相補的であるからである。例示的なアライメントアルゴリズムはＳｍｉｔｈ－ＷａｔｅｒｍａｎアルゴリズムおよびＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムであり、これらは当該技術分野において周知である。いずれのアルゴリズムの選択およびパラメーター設定が、アライメントされる配列の所与のペアについて適切であるかを当業者は理解し、一般に類似の長さを有し、アミノ酸について＞５０％またはヌクレオチドについて＞７５％の予測される同一性を有する配列について、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋウェブサーバーにおいてＥＢＩにより提供されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムインターフェースのデフォルトの設定を伴うＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムが一般に適切である。

【０２３７】

「ｍＲＮＡ」は、ポリペプチドに翻訳され得る（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働くことができる）オープンリーディングフレームを含むＤＮＡではないポリヌクレオチドを指すために本明細書において使用される。ｍＲＮＡは、リボース残基またはそのアナログ、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。一部の実施形態では、ｍＲＮＡ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、またはこれらの組合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を含有しない（例えば、０残基もしくは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）。ｍＲＮＡは、そのウリジン位置の一部ま

たは全てにおいて修飾ウリジンを含有することができる。

【０２３８】

本明細書において使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の「最少ウリジン含有量」は、（ａ）あらゆる位置において最少ウリジンコドンを使用し、かつ（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（１つまたは複数の）最少ウリジンコドンは、最も少ないウリジン（通常、最少ウリジンコドンが２つのウリジンを有するフェニルアラニンについてのコドンを除いて０または１）を有する（１つまたは複数の）コドンである。修飾ウリジン残基は、最少ウリジン含有量を評価する目的のためにウリジンと同等であると考えられる。

【０２３９】

本明細書において使用される場合、所与のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）の「最少ウリジンジヌクレオチド含有量」は、（ａ）あらゆる位置において（上記で議論したような）最少ウリジンコドンを使用し、かつ（ｂ）所与のＯＲＦと同じアミノ酸配列をコードする、ＯＲＦの最低の可能な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として絶対的規定において、またはウリジンジヌクレオチドのウリジンにより占有される位置のパーセンテージとして比率（例えば、ＡＵＵＡＵは、５つの位置の２つがウリジンジヌクレオチドのウリジンにより占有されるので、４０％のウリジンジヌクレオチド含有量を有する）を基準にして表すことができる。修飾ウリジン残基は、最少ウリジンジヌクレオチド含有量を評価する目的のためにウリジンと同等であると考えられる。

【０２４０】

本明細書において使用される場合、「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。

【０２４１】

本明細書において使用される場合、「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物を指す。アミロイドは不溶性であり、アミロイドは、臓器および組織中にタンパク質の沈着を生成し得る。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互いに付着して原線維を形成することを可能とする形態にミスフォールディングされ得る。アミロイドの一部の形態はヒト身体中で正常な機能を有し得るが、本明細書において使用される「アミロイド」は、タンパク質の異常なまたは病的な凝集物を指す。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んでもよく、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んでもよい。

【０２４２】

本明細書において使用される場合、「アミロイド原線維」は、分解に耐性のアミロイドの不溶性の繊維を指す。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の種類に基づいて症状を生じさせ得る。

【０２４３】

本明細書において使用される場合、「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り引き起こされる症状により特徴付けられる疾患を指す。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（ｄｉｇｅｓｔｉｖｅ ｔｒａｃｋ）などの多数の臓器に影響し得る。

【０２４４】

本明細書において使用される場合、「ＡＴＴＲ」、「ＴＴＲ関連アミロイドーシス」、「ＴＴＲアミロイドーシス」、「ＡＴＴＲアミロイドーシス」、または「ＴＴＲと関連付けられるアミロイドーシス」は、ＴＴＲの沈着と関連付けられるアミロイドーシスを指す。

【０２４５】

本明細書において使用される場合、「家族性アミロイド心筋症」または「ＦＡＣ」は、

主に拘束型心筋症により特徴付けられ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。鬱血性心不全はＦＡＣにおいて一般的である。発症の平均年齢は約６０～７０歳であり、診断後４～５年の平均余命が推定される。

【０２４６】

本明細書において使用される場合、「家族性アミロイド多発ニューロパチー」または「ＦＡＰ」は、主に感覚運動性ニューロパチーにより特徴付けられ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。自律性ニューロパチーはＦＡＰにおいて一般的である。ニューロパチーが主要な特徴であるが、ＦＡＰの症状としてはまた、悪液質、腎不全、および心臓疾患を挙げることができる。ＦＡＰの発症の平均年齢は約３０～５０歳であり、診断後５～１５年の平均余命が推定される。

【０２４７】

本明細書において使用される場合、「野生型ＡＴＴＲ」および「ＡＴＴＲｗｔ」は、病的なＴＴＲ突然変異、例えば、Ｔ６０Ａ、Ｖ３０Ｍ、Ｖ３０Ａ、Ｖ３０Ｇ、Ｖ３０Ｌ、Ｖ１２２Ｉ、Ｖ１２２Ａ、またはＶ１２２（－）と関連付けられないＡＴＴＲを指す。ＡＴＴＲｗｔはまた、老年性全身性アミロイドーシスとも称されてきた。発症は、典型的に、６０歳またはそれより高い年齢の男性において起こり、最も一般的な症状は、鬱血性心不全および異常な心臓リズム、例えば、心房細動である。追加の症状としては、心臓機能不良の帰結、例えば、息切れ、疲労、めまい、腫脹（特に脚の腫脹）、吐き気、アンギナ、睡眠障害、および体重減少が挙げられる。手根管症候群の病歴は、ＡＴＴＲｗｔのリスクの増加を指し示し、一部の場合には、早期疾患の指標となり得る。ＡＴＴＲｗｔは、一般に、心臓機能の経時的な減少をもたらすが、野生型ＴＴＲの沈着はより緩徐に蓄積するので、遺伝性ＡＴＴＲより良好な予後を有し得る。既存の治療はＡＴＴＲの他の形態と類似であり（肝臓移植以外）、一般に、心臓機能のサポートまたは改善を対象として、利尿剤ならびに限られた液体および塩分摂取から抗凝固剤に及び、重篤な症例では、心臓移植がある。それにもかかわらず、ＦＡＣと同様に、ＡＴＴＲｗｔは、場合により診断の３～５年以内に、心不全からの死を結果としてもたらし得る。

【０２４８】

本明細書に記載されるガイドＲＮＡ組成物および方法において有用なガイド配列を表１および本出願の全体にわたって示す。

【０２４９】

本明細書において使用される場合、「遺伝性ＡＴＴＲ」は、ＴＴＲ遺伝子の配列中の突然変異と関連付けられるＡＴＴＲを指す。ＡＴＴＲと関連付けられるＴＴＲ遺伝子中の公知の突然変異としては、Ｔ６０Ａ、Ｖ３０Ｍ、Ｖ３０Ａ、Ｖ３０Ｇ、Ｖ３０Ｌ、Ｖ１２２Ｉ、Ｖ１２２Ａ、またはＶ１２２（－）の置換を有するＴＴＲを結果としてもたらすものが挙げられる。

【０２５０】

本明細書において使用される場合、「インデル」は、標的核酸中の二本鎖切断（ＤＳＢ）の部位において挿入または欠失されるある数のヌクレオチドからなる挿入／欠失突然変異を指す。

【０２５１】

本明細書において使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、ｍＲＮＡ、または両方）の発現の減少を指す。タンパク質のノックダウンは、組織もしくは細胞の集団（例えば、血清もしくは細胞培地中）により分泌されるタンパク質を検出することにより、または目的の組織もしくは細胞集団からのタンパク質の総細胞量を検出することにより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公知であり、目的の組織または細胞集団から単離されたｍＲＮＡのシークエンシングが挙げられる。一部の実施形態では、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現の一部の喪失、例えば、細胞の集団（例えば、組織中に見出されるものなどのｉｎ　ｖｉｖｏ集団）により転写されるｍＲＮＡの量の減少または発現もしくは分泌されるタンパク質の減少を指すことがある。

【０２５２】
本明細書において使用される場合、「ノックアウト」は、細胞中の特定のタンパク質の発現の喪失を指す。ノックアウトは、組織もしくは細胞の集団（例えば、血清もしくは細胞培地中）からのタンパク質分泌物の量を検出することにより、または組織もしくは細胞の集団のタンパク質の総細胞量を検出することにより測定することができる。一部の実施形態では、本開示の方法は、１つまたは複数の細胞（例えば、組織中に見出されるものなどのｉｎ　ｖｉｖｏ集団などの細胞の集団）中のＴＴＲを「ノックアウト」する。一部の実施形態では、ノックアウトは、例えばインデルにより作製される、突然変異体ＴＴＲタンパク質の形成ではなく、細胞中のＴＴＲタンパク質の発現の完全な喪失である。
【０２５３】
本明細書において使用される場合、「突然変異体ＴＴＲ」は、ＴＴＲの野生型アミノ酸配列と比較してＴＴＲのアミノ酸配列における変化を有するＴＴＲの遺伝子産物（すなわち、ＴＴＲタンパク質）を指す。ヒト野生型ＴＴＲ配列は、ＮＣＢＩ遺伝子ＩＤ：７２７６；Ｅｎｓｅｍｂｌ：Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００１１８２７１において入手可能である。例えばヒトにおける、ＡＴＴＲと関連付けられるＴＴＲの突然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。
【０２５４】
本明細書において使用される場合、「突然変異体ＴＴＲ」または「突然変異体ＴＴＲアレル」は、野生型配列（ＮＣＢＩ遺伝子ＩＤ：７２７６；Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００１１８２７１）と比較してＴＴＲのヌクレオチド配列における変化を有するＴＴＲ配列を指す。
【０２５５】
本明細書において使用される場合、「リボ核タンパク質」（ＲＮＰ）または「ＲＮＰ複合体」は、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓクリベース、Ｃａｓニッカーゼ、またはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤と共にあるガイドＲＮＡを指す。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓ９などのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を標的配列にガイドし、ガイドＲＮＡは標的配列とハイブリダイズし、該剤は標的配列に結合し、剤がクリベースまたはニッカーゼである場合、結合の後に切断またはニック形成が起こり得る。
【０２５６】
本明細書において使用される場合、「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中の核酸の配列を指す。標的配列およびガイド配列の相互作用は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が標的配列内で結合し、場合によりニック形成または切断（剤の活性に応じて）を行うことを指令する。
【０２５７】
本明細書において使用される場合、「治療」は、対象における疾患または障害に対する治療法の任意の投与または適用を指し、疾患の阻害、その発症の阻止、疾患の１つもしくは複数の症状の緩和、疾患の治癒、または疾患の１つもしくは複数の症状の再発の予防を含む。例えば、ＡＴＴＲの治療は、ＡＴＴＲの症状の軽減を含み得る。
【０２５８】
「修飾ウリジン」は、ウリジンと同じ水素結合受容体を有しかつウリジンからの１つまたは複数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本明細書において使用される。一部の実施形態では、修飾ウリジンは置換ウリジン、すなわち、１つまたは複数の非プロトン置換基（例えば、アルコキシ、例えばメトキシ）がプロトンを置換するウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンはシュードウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは置換シュードウリジン、すなわち、１つまたは複数の非プロトン置換基（例えば、アルキル、例えばメチル）がプロトンを置換す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。一部の実施形態では、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いずれかである

。

【０２５９】

本明細書において使用される場合、第２の配列に対する第１の配列のアライメントが、第２の配列の全体のＸ％またはより多くの位置が第１の配列とマッチすることを示す場合に、第１の配列は第２の配列に対して「少なくともＸ％の同一性を有する配列を含む」と考えられる。例えば、配列ＡＡＧＡは配列ＡＡＧに対して１００％の同一性を有する配列を含み、その理由は、第２の配列の３つ全ての位置にマッチするという点でアライメントが１００％の同一性を与えるからである。ＲＮＡとＤＮＡとの差異（一般に、チミジンのウリジンによる交換またはその逆）および修飾ウリジンなどのヌクレオシドアナログの存在は、関連するヌクレオチド（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジン）が同じ相補体を有する限り（例えば、チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンの全てについてアデノシン；別の例はシトシンおよび５－メチルシトシンであり、これらの両方は相補体としてグアノシンを有する）、ポリヌクレオチドの間の同一性または相補性の差異に寄与しない。したがって、例えば、配列５’－ＡＸＧ（Ｘは、任意の修飾ウリジン、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）はＡＵＧと１００％同一であると考えられ、これは、両方が同じ配列（５’－ＣＡＵ）に完全に相補的であるからである。例示的なアライメントアルゴリズムはＳｍｉｔｈ－ＷａｔｅｒｍａｎアルゴリズムおよびＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムであり、これらは当該技術分野において周知である。いずれのアルゴリズムの選択およびパラメーター設定が、アライメントされる配列の所与のペアについて適切であるかを当業者は理解し、一般に類似の長さを有し、アミノ酸について＞５０％またはヌクレオチドについて＞７５％の予測される同一性を有する配列について、ｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋウェブサーバーにおいてＥＢＩにより提供されるＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムインターフェースのデフォルトの設定を伴うＮｅｅｄｌｅｍａｎ－Ｗｕｎｓｃｈアルゴリズムが一般に適切である。

【０２６０】

「約」（ａｂｏｕｔ）または「約」（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅｌｙ）という用語は、値が測定または決定される方法に部分的に依存する、当業者により決定される特定の値についての許容される誤差を意味する。

【０２６１】

ＩＩ．組成物

Ａ．ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物

例えば、ガイドＲＮＡをＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステム）と共に使用する、ＴＴＲ遺伝子を編集するために有用な組成物が本明細書において提供される。組成物は、野生型または非野生型ＴＴＲ遺伝子配列を有する対象、例えば、ＡＴＴＲｗｔまたは遺伝性もしくは家族性の形態のＡＴＴＲであり得るＡＴＴＲを有する対象に投与されてもよい。ＴＴＲ遺伝子を標的化するガイド配列を表１の配列番号：５～８２に示す。

【表１－１】

表 1:TTR 標的化ガイド配列、名称、染色体座標、および配列

| 配列番号 | ガイド ID | 説明 | 種 | 染色体位置 | ガイド配列* |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | CR003335 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591917-31591937 | CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC |
| 6 | CR003336 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591922-31591942 | CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC |
| 7 | CR003337 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591925-31591945 | CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG |
| 8 | CR003338 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591928-31591948 | AUACCAGUCCAGCAAGGCAG |
| 9 | CR003339 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591934-31591954 | ACACAAAUACCAGUCCAGCA |
| 10 | CR003340 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591937-31591957 | UGGACUGGUAUUUGUGUCUG |
| 11 | CR003341 | TTR（エクソン 1） | ヒト | chr18:31591941-31591961 | CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC |
| 12 | CR003342 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592880-31592900 | CUUCUCUACACCCAGGGCAC |
| 13 | CR003343 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592902-31592922 | CAGAGGACACUUGGAUUCAC |
| 14 | CR003344 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592911-31592931 | UUUGACCAUCAGAGGACACU |
| 15 | CR003345 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592919-31592939 | UCUAGAACUUUGACCAUCAG |
| 16 | CR003346 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592928-31592948 | AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG |
| 17 | CR003347 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592948-31592968 | CAUUGAUGGCAGGACUGCCU |
| 18 | CR003348 | TTR（エクソン 2） | ヒト | chr18:31592948-31592968 | AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG |

【表１－２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 19 | CR003349 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592958-31592978 | UGCACGGCCACAUUGAUGGC |
| 20 | CR003350 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592962-31592982 | CACAUGCACGGCCACAUUGA |
| 21 | CR003351 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592974-31592994 | AGCCUUUCUGAACACAUGCA |
| 22 | CR003352 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592986-31593006 | GAAAGGCUGCUGAUGACACC |
| 23 | CR003353 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592987-31593007 | AAAGGCUGCUGAUGACACCU |
| 24 | CR003354 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31593003-31593023 | ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC |
| 25 | CR003355 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31593007-31593027 | CCCAGAGGCAAAUGGCUCCC |
| 26 | CR003356 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31593015-31593035 | GCAACUUACCCAGAGGCAAA |
| 27 | CR003357 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31593022-31593042 | UUCUUUGGCAACUUACCCAG |
| 28 | CR003358 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595127-31595147 | AUGCAGCUCUCCAGACUCAC |
| 29 | CR003359 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595126-31595146 | AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA |
| 30 | CR003360 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595127-31595147 | GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU |
| 31 | CR003361 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595140-31595160 | GCUGCAUGGGCUCACAACUG |
| 32 | CR003362 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595143-31595163 | GCAUGGGCUCACAACUGAGG |
| 33 | CR003363 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595156-31595176 | ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA |
| 34 | CR003364 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595157-31595177 | CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA |

【表１－３】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 35 | CR003365 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595170-31595190 | UGUAGAAGGGAUAUACAAAG |
| 36 | CR003366 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595193-31595213 | AAAUAGACACCAAAUCUUAC |
| 37 | CR003367 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595197-31595217 | AGACACCAAAUCUUACUGGA |
| 38 | CR003368 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595205-31595225 | AAGUGCCUUCCAGUAAGAUU |
| 39 | CR003369 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595235-31595255 | CUCUGCAUGCUCAUGGAAUG |
| 40 | CR003370 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595236-31595256 | CCUCUGCAUGCUCAUGGAAU |
| 41 | CR003371 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595237-31595257 | ACCUCUGCAUGCUCAUGGAA |
| 42 | CR003372 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595242-31595262 | UACUCACCUCUGCAUGCUCA |
| 43 | CR003373 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598570-31598590 | GUAUUCACAGCCAACGACUC |
| 44 | CR003374 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598583-31598603 | GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU |
| 45 | CR003375 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598592-31598612 | AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC |
| 46 | CR003376 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598596-31598616 | CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG |
| 47 | CR003377 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598597-31598617 | GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG |
| 48 | CR003378 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598598-31598618 | GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC |
| 49 | CR003379 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598599-31598619 | GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG |
| 50 | CR003380 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598602-31598622 | GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG |

【表１－４】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 51 | CR003381 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598610-31598630 | GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA |
| 52 | CR003382 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598616-31598636 | GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG |
| 53 | CR003383 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598619-31598639 | AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA |
| 54 | CR003384 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598620-31598640 | AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC |
| 55 | CR003385 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598626-31598646 | CCCCUACUCCUAUUCCACCA |
| 56 | CR003386 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598629-31598649 | CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG |
| 57 | CR003387 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598630-31598650 | GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA |
| 58 | CR003388 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598637-31598657 | GACGACAGCCGUGGUGGAAU |
| 59 | CR003389 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598643-31598663 | AUUGGUGACGACAGCCGUGG |
| 60 | CR003390 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598646-31598666 | GGGAUUGGUGACGACAGCCG |
| 61 | CR003391 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598647-31598667 | GGCUGUCGUCACCAAUCCCA |
| 62 | CR003392 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598661-31598681 | AGUCCCUCAUUCCUUGGGAU |
| 63 | CR005298 | TTR（エクソン1） | ヒト | chr18:31591883-31591903 | UCCACUCAUUCUUGGCAGGA |
| 64 | CR005299 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598631-31598651 | AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU |
| 65 | CR005300 | TTR（エクソン1） | ヒト | chr18:31591967-31591987 | UCACAGAAACACUCACCGUA |
| 66 | CR005301 | TTR（エクソン1） | ヒト | chr18:31591968-31591988 | GUCACAGAAACACUCACCGU |

【表１－５】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 67 | CR005302 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592874-31592894 | ACGUGUCUUCUCUACACCCA |
| 68 | CR005303 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592903-31592923 | UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA |
| 69 | CR005304 | TTR（エクソン2） | ヒト | chr18:31592969-31592989 | GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA |
| 70 | CR005305 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595114-31595134 | UAUAGGAAAACCAGUGAGUC |
| 71 | CR005306 | TTR（エクソン3） | ヒト | chr18:31595204-31595224 | AAAUCUUACUGGAAGGCACU |
| 72 | CR005307 | TTR（エクソン4） | ヒト | chr18:31598548-31598568 | UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG |
| 73 | CR000689 | TTR | カニクイザル | chr18:50681533-50681553 | ACACAAAUACCAGUCCAGCG |
| 74 | CR005364 | TTR | カニクイザル | chr18:50680481-50680501 | AAAGGCUGCUGAUGAGACCU |
| 75 | CR005365 | TTR | カニクイザル | chr18:50680520-50680540 | CAUUGACAGCAGGACUGCCU |
| 76 | CR005366 | TTR | カニクイザル | chr18:50681539-50681559 | AUACCAGUCCAGCGAGGCAG |
| 77 | CR005367 | TTR | カニクイザル | chr18:50681542-50681562 | CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG |
| 78 | CR005368 | TTR | カニクイザル | chr18:50681545-50681565 | CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC |
| 79 | CR005369 | TTR | カニクイザル | chr18:50680540-50680560 | AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG |
| 80 | CR005370 | TTR | カニクイザル | chr18:50680594-50680614 | ACUUGUCUUCUCUAUACCCA |
| 81 | CR005371 | TTR | カニクイザル | chr18:50678216-50678236 | AAGUGACUUCCAGUAAGAUU |
| 82 | CR005372 | TTR | カニクイザル | chr18:50680482-50680502 | AAAAGGCUGCUGAUGAGACC |

【０２６２】

上記の各ガイド配列は、追加のヌクレオチドをさらに含むことにより、例えば、ガイド配列にその３’末端において後続する以下の例示的なヌクレオチド配列：ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号：１２６）を含むｃｒＲＮＡを形成してもよい。ｓｇＲＮＡの場合、上記のガイド配列は、追加のヌクレオチドをさらに含むことにより、例えば、ガイド配列の３’末端に後続する、５’から３’の向きに以下の例示的なヌクレオチド配列：ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号：１２５）を含むｓｇＲＮＡを形成してもよい。

【０２６３】

一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは修飾されている。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、以下の配列番号：３に示す修飾パターンを含み、Ｎは任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、かつ、Ｎは全体として本明細書に記載されるようなガイド配列を含み、かつ修飾ｓｇＲＮＡは、以下の配列：ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号：３）を含み、「Ｎ」は任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよい。例えば、配列番号：３において、Ｎが本明細書において開示される任意のガイド配列により置換されたものが本明細書に包含される。ガイドのヌクレオチドがＮにより置換されているにもかかわらず、修飾は配列番号：３に示すままとなる。すなわち、ガイドのヌクレオチドが「Ｎ」に取って代わるが、最初の３つのヌクレオチドは２’ＯＭｅ修飾されており、かつ１つ目のヌクレオチドと２つ目のヌクレオチドとの間、２つ目のヌクレオチドと３つ目のヌクレオチドとの間および３つ目のヌクレオチドと４つ目のヌクレオチドとの間にホスホロチオエート連結が存在する。

【０２６４】

一部の実施形態では、表２に記載する配列のいずれか１つが包含される。

【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*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 88 | G000481 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 89 | G000482 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 90 | G000483 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 91 | G000484 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mA*mG*mA*CACCAAAUCUUACUGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 92 | G000485 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 93 | G000486 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 94 | G000487 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 95 | G000488 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 96 | G000489 | TTR sgRNA修飾配列 | ヒト | mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |

【表２－２】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 97 | G000490 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mA*mA*mA*UAGACACCAAAUCUUACGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 98 | G000491 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 99 | G000492 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 100 | G000493 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mA*mA*mG*UGCCUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 101 | G000494 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 102 | G000495 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 103 | G000496 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 104 | G000497 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 105 | G000498 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 106 | G000499 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 107 | G000500 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 108 | G000501 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |

【表２－３】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 109 | G000567 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 110 | G000568 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCCCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 111 | G000570 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 112 | G000571 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 113 | G000572 | TTR sgRNA 修飾配列 | ヒト | mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCCACCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 114 | G000502 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 115 | G000503 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGACCGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 116 | G000504 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGACCUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 117 | G000505 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 118 | G000506 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 119 | G000507 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 120 | G000508 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |

【表２－４】

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 121 | G000509 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 122 | G000510 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 123 | G000511 | TTR カニクイザル特異的 sgRNA 修飾配列 | カニクイザル | mA*mA*mG*UGACUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |
| 124 | G000282 | TTR | マウス | mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU |

*=PS 連結；「m」=2’-O-Me ヌクレオチド

【０２６５】

対応するｓｇＲＮＡ　ＩＤとのガイドＩＤのアライメントマッピングの他に、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のマッチしたガイドＩＤを表３に提供する。

【表３－１】

表３：標的化ガイド配列の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に対するミスマッチ数 | カニクイザルのマッチしたdgRNA ID | カニクイザルのマッチしたsgRNA ID |
|---|---|---|---|---|---|
| TTR | CR003335 | G000497 | 1 | | |
| TTR | CR003336 | G000485 | 1 | CR005368 | G000508 |
| TTR | CR003337 | G000500 | 1 | CR005367 | G000507 |
| TTR | CR003338 | G000491 | 1 | CR005366 | G000506 |
| TTR | CR003339 | G000486 | 1 | CR000689 | G000502 |
| TTR | CR003340 | | 0 | | |
| TTR | CR003341 | | 0 | | |
| TTR | CR003342 | G000492 | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR003343 | G000495 | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR003344 | G000489 | 0 | | |
| TTR | CR003345 | G000481 | 0 | | |
| TTR | CR003346 | G000488 | 1 | CR005369 | G000509 |
| TTR | CR003347 | G000570 | 2 | CR005365 | G000505 |
| TTR | CR003348 | | 2 | | |
| TTR | CR003349 | | >3 | | |
| TTR | CR003350 | | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR003351 | | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR003352 | G000567 | 2 | CR005372 | G000503 |
| TTR | CR003353 | G000480 | 1 | CR005364 | G000504 |
| TTR | CR003354 | | 1 | | |
| TTR | CR003355 | | 1 | | |
| TTR | CR003356 | | 3 | | |
| TTR | CR003357 | G000487 | >3 | | |
| TTR | CR003358 | | 0 | | |
| TTR | CR003359 | G000498 | 0 | | |
| TTR | CR003360 | G000494 | 0 | | |
| TTR | CR003361 | | 0 | | |
| TTR | CR003362 | | 0 | | |
| TTR | CR003363 | | 0 | | |
| TTR | CR003364 | | 0 | | |
| TTR | CR003365 | G000482 | 0 | | |
| TTR | CR003366 | G000490 | 0 | | |
| TTR | CR003367 | G000484 | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR003368 | G000493 | 1 | CR005371 | G000511 |
| TTR | CR003369 | | 0 | | |
| TTR | CR003370 | | 0 | | |
| TTR | CR003371 | | 0 | | |

【表３－２】

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TTR | CR003372 | | 0 | | |
| TTR | CR003373 | | 1 | | |
| TTR | CR003374 | | 2 | | |
| TTR | CR003375 | | 2 | | |
| TTR | CR003376 | | 2 | | |
| TTR | CR003377 | | 2 | | |
| TTR | CR003378 | | 2 | | |
| TTR | CR003379 | | 2 | | |
| TTR | CR003380 | | 1 | | |
| TTR | CR003381 | | 1 | | |
| TTR | CR003382 | | 0 | | |
| TTR | CR003383 | | 0 | | |
| TTR | CR003384 | | 0 | | |
| TTR | CR003385 | G000572 | 0 | | |
| TTR | CR003386 | | 0 | | |
| TTR | CR003387 | | 0 | | |
| TTR | CR003388 | | 0 | | |
| TTR | CR003389 | G000569 | 0 | | |
| TTR | CR003390 | | 0 | | |
| TTR | CR003391 | G000568 | 0 | | |
| TTR | CR003392 | | 0 | | |
| TTR | CR005298 | G000483 | 1 | | |
| TTR | CR005299 | | 0 | | |
| TTR | CR005300 | G000501 | カニクイザルにおいてPAMなし | | |
| TTR | CR005301 | G000571 | 0 | | |
| TTR | CR005302 | | 2 | CR005370 | G000510 |
| TTR | CR005303 | G000499 | 0 | | |
| TTR | CR005304 | G000496 | >3 | | |
| TTR | CR005305 | | 0 | | |
| TTR | CR005306 | | 1 | | |
| TTR | CR005307 | | 0 | | |

【０２６６】

一部の実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９）であり得るＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をＴＴＲ中の標的ＤＮＡ配列に方向付けるガイド配列を含む１つまたは複数のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物を提供する。ｇＲＮＡは、表１に示すガイド配列を含むｃｒＲＮＡを含んでもよい。ｇＲＮＡは、表１に示すガイド配列の１７、１８、１９、または２０の連続するヌクレオチドを含むｃｒＲＮＡを含んでもよい。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１に示すガイド配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０の連続するヌクレオチドに対して約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。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、表１に示す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をさらに含んでもよい。本明細書に記載される各組成物および方法の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一のＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）として会合していてもよく、または別々のＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）上にあってもよい。ｓｇＲＮＡの文脈において、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡ成分は、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、共有結合により連結されていてもよい。

【０２６７】

本明細書に記載される組成物、使用、および方法の各実施形態では、ガイドＲＮＡは、「デュアルガイドＲＮＡ」または「ｄｇＲＮＡ」として２つのＲＮＡ分子を含んでもよい。ｄｇＲＮＡは、例えば、表１に示すガイド配列を含むｃｒＲＮＡを含む第１のＲＮＡ分子、およびｔｒＲＮＡを含む第２のＲＮＡ分子を含む。第１および第２のＲＮＡ分子は共有結合により連結されていなくてもよいが、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡの部分間の塩基対形成を介してＲＮＡデュプレックスを形成していてもよい。

【０２６８】

本明細書に記載される組成物、使用、および方法の各実施形態では、ガイドＲＮＡは、

「シングルガイドＲＮＡ」または「ｓｇＲＮＡ」として単一のＲＮＡ分子を含んでもよい。ｓｇＲＮＡは、ｔｒＲＮＡに共有結合により連結された表１に示すガイド配列を含むｃｒＲＮＡ（またはその部分）を含んでもよい。ｓｇＲＮＡは、表１に示すガイド配列の１７、１８、１９、または２０の連続するヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、リンカーを介して共有結合により連結されている。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡの部分間の塩基対形成を介してステムループ構造を形成する。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、ホスホジエステル結合ではない１つまたは複数の結合を介して共有結合により連結されている。

【０２６９】

一部の実施形態では、ｔｒＲＮＡは、天然に存在するＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムに由来するｔｒＲＮＡ配列の全体または部分を含んでもよい。一部の実施形態では、ｔｒＲＮＡは、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システムに依存する。一部の実施形態では、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より多くのヌクレオチドを含むまたはからなる。一部の実施形態では、ｔｒＲＮＡは、ある特定の二次構造、例えば、１つもしくは複数のヘアピンもしくはステムループ構造、または１つもしくは複数のバルジ構造などを含んでもよい。

【０２７０】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号：５～８２のいずれか１つのガイド配列を含む１つまたは複数のガイドＲＮＡを含む組成物を提供する。

【０２７１】

一態様では、本発明は、配列番号：５～８２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％同一のガイド配列を含むｇＲＮＡを含む組成物を提供する。

【０２７２】

他の実施形態では、組成物は、配列番号：５～８２のガイド配列の任意の２つまたはそれより多く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。一部の実施形態では、組成物は、配列番号：５～８２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％同一のガイド配列をそれぞれが含む少なくとも２つのｇＲＮＡを含む。

【０２７３】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、表２に示す配列（配列番号８７～１２４）のいずれか１つを含むｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、表２に示す配列（配列番号８７～１２４であるが、示すような修飾を有しない（すなわち、非修飾の配列番号８７～１２４）のいずれか１つを含むｓｇＲＮＡである。一部の実施形態では、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％同一の配列を含む。一部の実施形態では、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、示すような修飾を有しない配列（すなわち、非修飾の配列番号８７～１２４）を含む。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、修飾ありまたはなしで、表２の配列番号：８７～１２４におけるｓｇＲＮＡ配列に示すガイド配列の代わりに表１に示すガイド配列のいずれか１つを含む。

【０２７４】

本発明のガイドＲＮＡ組成物は、ＴＴＲ遺伝子中の標的配列を認識する（例えば、該配列にハイブリダイズする）ように設計される。例えば、ＴＴＲ標的配列は、ガイドＲＮＡを含む提供されるＣａｓクリベースにより認識および切断されてもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓクリベースなどのガイド核酸結合剤は、ガイドＲＮＡによりＴＴＲ

遺伝子の標的配列に方向付けられてもよく、ガイドＲＮＡのガイド配列は標的配列とハイブリダイズし、Ｃａｓクリベースなどの ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は標的配列を切断する。

【０２７５】

一部の実施形態では、１つまたは複数のガイド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。

【０２７６】

いかなる特定の理論によっても縛られないが、遺伝子のある特定の領域における突然変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性のＤＳＢの結果として起こるインデルの結果としてもたらされるフレームシフト突然変異）は、遺伝子の他の領域における突然変異よりも低い許容性のことがあるため、ＤＳＢの位置は、結果として起こり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。一部の実施形態では、ＴＴＲ遺伝子中の特定の位置にＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を方向付けるために、ＴＴＲ内の標的配列に相補的なまたは相補性を有するｇＲＮＡが使用される。一部の実施形態では、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における標的配列に相補的な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る。

【０２７７】

一部の実施形態では、ガイド配列は、ヒトＴＴＲ遺伝子中に存在する標的配列と少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％同一である。一部の実施形態では、標的配列は、ガイドＲＮＡのガイド配列に相補的であってもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡのガイド配列とその対応する標的配列との相補性または同一性の程度は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であってもよい。一部の実施形態では、標的配列およびｇＲＮＡのガイド配列は、１００％相補的または同一であってもよい。他の実施形態では、標的配列およびｇＲＮＡのガイド配列は、少なくとも１つのミスマッチを含有してもよい。例えば、標的配列およびｇＲＮＡのガイド配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有してもよく、ガイド配列の全長は２０である。一部の実施形態では、標的配列およびｇＲＮＡのガイド配列は、１～４個のミスマッチを含有してもよく、ガイド配列は２０ヌクレオチドである。

【０２７８】

一部の実施形態では、本明細書において開示される組成物または配合物は、本明細書に記載されるようなＣａｓヌクレアーゼなどの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（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡが提供され、使用され、または投与される。

【０２７９】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はクラス２　Ｃａｓヌクレアーゼである。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得るクリベース活性を有する。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、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）などのＣａｓヌクレアーゼを含む。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これらの改変が挙げられる。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの例としては、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）、Ｓ．アウレウス（S. aureus）、および他の原核生物（例えば、次の段落中のリストを参照）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣａｓ９ヌクレアーゼ、ならびにこれらの改変（例えば、操作または突然変異体）型が挙げられる。例えば、ＵＳ２０１６／０３１２１９８　Ａ１；ＵＳ　２０１６／０３１２１９９　Ａ１を参照。Ｃａｓヌクレアーゼの他の例としては、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣｓｍもしくはＣｍｒ複合体またはそのＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、もしくはＣｍｒ２サブユニット；およびＩ型ＣＲＩＳＰＲシステム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。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩＡ型、ＩＩＢ型、またはＩＩＣ型システムからのものであってもよい。様々なＣＲＩＳＰＲシステムおよびＣａｓヌクレアーゼの議論について、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。

【０２８０】

Ｃａｓヌクレアーゼが由来し得る非限定的な例示的な種としては、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）、ストレプトコッカス属菌（Streptococcus sp.）、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）、リステリア・イノキュア（Listeria innocua）、ラクトバチルス・ガセリ（Lactobacillus gasseri）、フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）、ウォリネラ・サクシノゲネス（Wolinella succinogenes）、サテレラ・ワズワーセンシス（Sutterella wadsworthensis）、ガンマプロテオバクテリウム（Gammaproteobacterium）、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）、カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）、パスツレラ・ムルトシダ（Pasteurella multocida）、フィブロバクター・サクシノゲネス（Fibrobacter succinogene）、ロドスピリルム・ラブラム（Rhodospirillum rubrum）、ノカルジオプシス・ダソンビレイ（Nocardiopsis dassonvillei）、ストレプトミセス・プリスチナスピラリス（Streptomyces pristinaespiralis）、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネス（Streptomyces viridochromogenes）、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネス（Streptomyces viridochromogenes）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（Streptosporangium roseum）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（Streptosporangium roseum）、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス（Alicyclobacillus acidocaldarius）、バチルス・シュードミコイデス（Bacillus pseudomycoides）、バチルス・セレニチレデュセンス（Bacillus selenitireducens）、エキシグオバクテリウム・シビリカム（Exiguobacterium sibiricum）、ラクトバチルス・デルブルエッキー（Lactobacillus delbrueckii）、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius）、ラクトバチルス・ブクネリ（Lactobacillus buchneri）、トレポネーマ・デンチコラ（Treponema denticola）、ミクロシラ・マリナ（Microscilla marina）、バークホルデリア目（Burkholderiales）細菌、ポラロモナス・ナフタレニボランス（Polaromonas naphthalenivorans）、ポラロモナス属菌（Polaromonas sp.）、クロコスファエラ・ワトソニー（Crocosphaera watsonii）、シアノテセ属菌（Cyanothece sp.）、ミクロシスチス・エルギノーサ（Microcystis aeruginosa）、シネココッカス属菌（Synechococcus sp.）、アセトハロビウム・アラバチカム（Acetohalobium arabaticum）、アンモニフェクス・デジェンシー（Ammonifex degensii）、カルディセルロシルプター・ベシー（Caldicelulosiruptor becscii）、カンジダツス・デスルフォルディス（Candidatus Desulforudis）、クロストリジウム・ボツリヌム（Clostridium botulinum）、クロストリジウム・ディフィシル（Clostridium difficile）、フィネゴルディア・マグナ（Finegoldia magna）、ナトラナエロビウス・サーモフィラス（Natranaerobius thermophilus）、ペロトマクラム・サーモプロピオニカム（Pelotomaculum thermopropionicum）、アシディチオバチルス・カルダス（Acidithiobacillus caldus）、アシディチオバチルス・フェロオキシダンス（Acidithiobacillus ferrooxidans）、アロクロマチウム・ビノスム（Allochromatium vinosum）、マリノバクター属菌（Marinobacter sp.）、ニトロソコッカス・ハロフィルス（Nitrosococcus halophilus）、ニトロソコッカス・ワトソニー（Nitrosococcus watsoni）、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス（Pseudoalteromonas haloplanktis）、クテドノバクター・ラセミフェル（Ktedonobacter racemifer）、メタノハロビウム・エベスチガータム（Methanohalobium evestigatum）、アナベナ・バリアビリス（Anabaena variabilis）、ノドゥラリア・スプミゲナ（Nodularia spumigena）、ノストク属菌（Nostoc sp.）、アルスロスピ

ラ・マキシマ（Arthrospira maxima）、アルスロスピラ・プラテンシス（Arthrospira platensis）、アルスロスピラ属菌（Arthrospira sp.）、リングビア属菌（Lyngbya sp.）、ミクロコレウス・クソノプラステス（Microcoleus chthonoplastes）、オシラトリア属菌（Oscillatoria sp.）、ペトロトガ・モビリス（Petrotoga mobilis）、サーモシフォ・アフリカヌス（Thermosipho africanus）、ストレプトコッカス・パスツリアヌス（Streptococcus pasteurianus）、ナイセリア・シネレア（Neisseria cinerea）、カンピロバクター・ラリ（Campylobacter lari）、パルビバクラム・ラバメンティボランス（Parvibaculum lavamentivorans）、コリネバクテリウム・ジフテリア（Corynebacterium diphtheria）、アシドアミノコッカス属菌（Acidaminococcus sp.）、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌ＮＤ２００６、およびアカリオクロリス・マリナ（Acaryochloris marina）が挙げられる。

【０２８１】

一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、アシドアミノコッカス属菌（Acidaminococcus sp.）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌ＮＤ２００６のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。さらなる実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、フランシセラ・ツラレンシス（Francisella tularensis）、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌、ブチリビブリオ・プロテオクラスチカス（Butyrivibrio proteoclasticus）、ペレグリニバクテリア（Peregrinibacteria）細菌、パルクバクテリア（Parcubacteria）細菌、スミセラ（Smithella）、アシドアミノコッカス（Acidaminococcus）、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（Candidatus Methanoplasma termitum）、ユーバクテリウム・エリゲンス（Eubacterium eligens）、モラクセラ・ボボクリ（Moraxella bovoculi）、レプトスピラ・イナダイ（Leptospira inadai）、ポルフィロモナス・クレビオリカニス（Porphyromonas crevioricanis）、プレボテラ・ディシエンス（Prevotella disiens）、またはポルフィロモナス・マカカエ（Porphyromonas macacae）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。ある特定の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、アシドアミノコッカス属（Acidaminococcus）またはラクノスピラセアエ属（Lachnospiraceae）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。

【０２８２】

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。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、１つより多くのＲｕｖＣドメインおよび／または１つより多くのＨＮＨドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは野生型Ｃａｓ９である。一部の実施形態では、Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡ中の二本鎖切断を誘導することができる。ある特定の実施形態では、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クリベースおよびニッカーゼ活性のいずれも有しなくてもよい。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。開始コドン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：２０４として提供される。融合タンパク質中に含めるために好適な例示的なＣａｓ９　ｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１０として提供される。

【０２８３】

一部の実施形態では、キメラＣａｓヌクレアーゼが使用され、該キメラＣａｓヌクレア

ーゼでは、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部分により置換されている。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１などの異なるヌクレアーゼからのドメインで置換されていてもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、改変されたヌクレアーゼであってもよい。

【０２８４】

他の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからのものであってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムのカスケード複合体の成分であってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは Ｃａｓ３タンパク質であってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからのものであってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは ＲＮＡ切断活性を有してもよい。

【０２８５】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、１つのＤＮＡ鎖を切断して、「ニック」としても公知の一本鎖切断を生成することができる。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はＣａｓニッカーゼを含む。ニッカーゼは、ｄｓＤＮＡ中にニックを作製する、すなわち、ＤＮＡ二重らせんの１つの鎖を切断するが他方を切断しない酵素である。一部の実施形態では、Ｃａｓニッカーゼは、エンドヌクレアーゼ切断活性部位が、例えば触媒ドメイン中の１つまたは複数の変化（例えば、点突然変異）により、不活性化されているバージョンのＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上記で議論したＣａｓヌクレアーゼ）である。例えば、Ｃａｓニッカーゼおよび例示的な触媒ドメインの変化の議論について米国特許第８，８８９，３５６号明細書を参照。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼなどのＣａｓニッカーゼは、不活性化されたＲｕｖＣまたはＨＮＨドメインを有する。例示的なＣａｓ９ニッカーゼのアミノ酸配列は配列番号：２０６として提供される。開始コドンおよび終止コドンを含む例示的なＣａｓ９ニッカーゼｍＲＮＡ　ＯＲＦ配列は配列番号：２０７として提供される。融合タンパク質に含めるために好適な例示的なＣａｓ９ニッカーゼｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１１として提供される。

【０２８６】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つのみの機能的なヌクレアーゼドメインを含有するように改変される。例えば、剤のタンパク質は、ヌクレアーゼドメインの１つが突然変異または全体的もしくは部分的に欠失してその核酸切断活性を低減させるように改変されていてもよい。一部の実施形態では、低減した活性を有するＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、不活性のＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、低減した活性を有するＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、不活性のＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。

【０２８７】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存されたアミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または変化させるように置換されている。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン中のアミノ酸置換を含んでもよい。ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ１０Ａ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ Ｏｃｔ　２２：１６３（３）：７５９－７７１を参照。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン中のアミノ酸置換を含んでもよい。ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８３Ａ、およびＤ９８６Ａ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）を参照。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、およびＤ１２５５Ａ（フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida

）Ｕ１１２　Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ａ０Ｑ７Ｑ２（ＣＰＦ１＿ＦＲＡＴＮ）に基づく）が挙げられる。

【０２８８】

一部の実施形態では、ニッカーゼをコードするｍＲＮＡが、標的配列のセンスおよびアンチセンス鎖にそれぞれ相補的な一対のガイドＲＮＡと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドＲＮＡは、ニッカーゼを標的配列に方向付け、標的配列の反対鎖にニックを生成すること（すなわち、二重ニック形成）によりＤＳＢを導入する。一部の実施形態では、二重ニック形成の使用は、特異性を向上させかつオフターゲット効果を低減させ得る。一部の実施形態では、ニッカーゼは、ＤＮＡの反対鎖を標的化して標的ＤＮＡ中に二重ニックを生成する２つの別々のガイドＲＮＡと共に使用される。一部の実施形態では、ニッカーゼは、近接して標的ＤＮＡ中に二重ニックを生成するように選択される２つの別々のガイドＲＮＡと共に使用される。

【０２８９】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリベースおよびニッカーゼ活性を欠いている。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドを含む。ｄＣａｓポリペプチドは、ＤＮＡ結合活性を有すると共に、触媒（クリベース／ニッカーゼ）活性を本質的に欠いている。一部の実施形態では、ｄＣａｓポリペプチドはｄＣａｓ９ポリペプチドである。一部の実施形態では、クリベースおよびニッカーゼ活性を欠いたＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはｄＣａｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドは、そのエンドヌクレアーゼ切断活性部位が、例えばその触媒ドメイン中の１つまたは複数の変化（例えば、点突然変異）により、不活性化されているバージョンのＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上記で議論したＣａｓヌクレアーゼ）である。例えば、ＵＳ　２０１４／０１８６９５８　Ａ１；ＵＳ　２０１５／０１６６９８０　Ａ１を参照。例示的なｄＣａｓ９アミノ酸配列は配列番号：２０８として提供される。開始コドンおよび終止コドンを含む例示的なｄＣａｓ９　ｍＲＮＡ　ＯＲＦ配列は配列番号：２０９として提供される。融合タンパク質に含めるために好適な例示的なｄＣａｓ９　ｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１２として提供される。

【０２９０】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つまたは複数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）。

【０２９１】

一部の実施形態では、異種機能ドメインは、細胞の核へのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の輸送を促進してもよい。例えば、異種機能ドメインは核局在シグナル（ＮＬＳ）であってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つのＮＬＳと融合していてもよい。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤配列のＮ末端またはＣ末端において連結されてもよい。それはまた、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤配列内に挿入されてもよい。他の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つより多くのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２、３、４、または５つのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２つのＮＬＳと融合していてもよい。ある特定の状況では、２つのＮＬＳは、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）または異なってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、カルボキシ末端において連結された２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列に融合している。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２つのＮＬＳと融合していてもよく、１つはＮ末端において、および１つはＣ末端において連結していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、３つのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＮＬＳと融合していなくてもよい。一部の実施形態では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号：２７４）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号

：２７５）などの単節型配列であってもよい。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号：２７６）などの双節型配列であってもよい。特定の実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号：２７４）のＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端において連結していてもよい。１つまたは複数のリンカーが任意選択的に融合部位に含められる。

【０２９２】

一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞内半減期を改変できるものであってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期は増加されてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期は低減されてもよい。一部の実施形態では、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ものであってもよい。一部の実施形態では、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ものであってもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解用のシグナルペプチドとして作用してもよい。一部の実施形態では、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、またはカルパインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素により媒介されてもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＰＥＳＴ配列を含んでもよい。一部の実施形態では、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り修飾されてもよい。一部の実施形態では、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）としても公知）、ユビキチン関連修飾因子１（ＵＲＭ１）、神経前駆細胞発現、発生的にダウンレギュレートされたタンパク質８（ｎｅｕｒｏｎａｌ－ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ－ｃｅｌｌ－ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌｌｙ ｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ－８；ＮＥＤＤ８；Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）においてＲｕｂ１とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原Ｆ結合型（ｈｕｍａｎ ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ Ｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ；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）、膜アンカー型ＵＢＬ（ＭＵＢ）、ユビキチンフォールド修飾因子１（ＵＦＭ１）、およびユビキチン様タンパク質５（ＵＢＬ５）が挙げられる。

【０２９３】

一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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 ｍｏｎｏｍｅｒ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄ１、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、および橙色蛍光タンパク質（ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）または任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態では、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ー精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、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キャリアタンパク質（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、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ベータガラクトシダーゼ、ベータグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【０２９４】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を特定の細胞小器官、細胞種、組織、または臓器に標的化してもよい。一部の実施形態では、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てもよい。

【０２９５】

さらなる実施形態では、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方向付けられる場合、例えば、ＣａｓヌクレアーゼがｇＲＮＡにより標的配列に方向付けられる場合、エフェクタードメインは標的配列を修飾しまたは標的配列に影響してもよい。一部の実施形態では、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Ｄ）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写リプレッサードメインから選択されてもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＦｏｋＩヌクレアーゼなどのヌクレアーゼである。例えば、米国特許第９，０２３，６４９号明細書を参照。一部の実施形態では、異種機能ドメインは転写活性化因子またはリプレッサーである。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。そのため、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方向付けられて結合できる転写因子となる。

【０２９６】

Ｂ．修飾ｇＲＮＡおよびｍＲＮＡ

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは化学的に修飾されている。１つまたは複数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残基に代えてまたは該残基に加えて使用される１つまたは複数の天然に存在しないおよび／または天然に存在する成分または構成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。一部の実施形態では、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「修飾されている」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、（ｉ）ホスホジエステル骨格連結中の非連結

性リン酸酸素の１つもしくは両方および／または連結性リン酸酸素の１つもしくは複数の変更、例えば、置換（例示的な骨格修飾）；（ｉｉ）リボース糖の構成要素、例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの変化、例えば、置換（例示的な糖修飾）；（ｉｉｉ）「脱リン酸」リンカーによるリン酸部分の大規模な置換（例示的な骨格修飾）；（ｉｖ）非標準的な核酸塩基などによる天然に存在する核酸塩基の修飾または置換（例示的な塩基修飾）；（ｖ）リボースリン酸骨格の置換または修飾（例示的な骨格修飾）；（ｖｉ）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、修飾もしくは置換、または部分、キャップもしくはリンカーの共役（そのような３’または５’キャップ修飾は糖および／または骨格修飾を含んでもよい）；ならびに（ｖｉｉ）糖の修飾または置換（例示的な糖修飾）の１つまたは複数を含むことができる。

【０２９７】

上記のように、一部の実施形態では、本明細書において開示される組成物または配合物は、本明細書に記載されるようなＣａｓヌクレアーゼなどの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（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡが提供され、使用され、または投与される。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするＯＲＦは、「修飾ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ＯＲＦ」または単純に「修飾ＯＲＦ」であり、これは、ＯＲＦが以下の方法の１つまたは複数において修飾されていることを指し示すための短縮化として使用される：（１）修飾ＯＲＦは、その最少ウリジン含有量から最少ウリジン含有量の１５０％までの範囲内のウリジン含有量を有する；（２）修飾ＯＲＦは、その最少ウリジンジヌクレオチド含有量から最少ウリジンジヌクレオチド含有量の１５０％までの範囲内のウリジンジヌクレオチド含有量を有する；（３）修飾ＯＲＦは、配列番号：２０１、２０４、２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、もしくは２６６のいずれか１つに対して少なくとも９０％の同一性を有する；（４）修飾ＯＲＦは、少なくとも７５％のコドンが最少ウリジンコドンの表３Ａに列記されるコドンであるコドンのセットからなる；または（５）修飾ＯＲＦは少なくとも１つの修飾ウリジンを含む。一部の実施形態では、修飾ＯＲＦは、以上の方法の少なくとも２、３、または４つにおいて修飾されている。一部の実施形態では、修飾ＯＲＦは少なくとも１つの修飾ウリジンを含み、かつ上記の（１）～（４）の少なくとも１、２、３、または全てにおいて修飾されている。

【表３Ａ】

**最少ウリジンコドンの表 3A**

| | アミノ酸 | 最少ウリジンコドン |
|---|---|---|
| A | アラニン | GCA または GCC または GCG |
| G | グリシン | GGA または GGC または GGG |
| V | バリン | GUC または GUA または GUG |
| D | アスパラギン酸 | GAC |
| E | グルタミン酸 | GAA または GAG |
| I | イソロイシン | AUC または AUA |
| T | スレオニン | ACA または ACC または ACG |
| N | アスパラギン | AAC |
| K | リジン | AAG または AAA |
| S | セリン | AGC |
| R | アルギニン | AGA または AGG |
| L | ロイシン | CUG または CUA または CUC |
| P | プロリン | CCG または CCA または CCC |
| H | ヒスチジン | CAC |
| Q | グルタミン | CAG または CAA |
| F | フェニルアラニン | UUC |
| Y | チロシン | UAC |
| C | システイン | UGC |
| W | トリプトファン | UGG |
| M | メチオニン | AUG |

【０２９８】

以上の任意の実施形態では、修飾ＯＲＦは、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％のコドンが、最少ウリジンコドンを示す表３Ａに列記されるコドンであるコドンのセットからなるものであってもよい。

【０２９９】

以上の任意の実施形態では、修飾ＯＲＦは、配列番号：２０１、２０４、２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つに対して少なくとも９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有する配列を含んでもよい。

【０３００】

以上の任意の実施形態では、修飾ＯＲＦは、その最少ウリジン含有量から最少ウリジン含有量の１５０％、１４５％、１４０％、１３５％、１３０％、１２５％、１２０％、１１５％、１１０％、１０５％、１０４％、１０３％、１０２％、または１０１％までの範囲内のウリジン含有量を有してもよい。

【０３０１】

以上の任意の実施形態では、修飾ＯＲＦは、その最少ウリジンジヌクレオチド含有量から最少ウリジンジヌクレオチド含有量の１５０％、１４５％、１４０％、１３５％、１３０％、１２５％、１２０％、１１５％、１１０％、１０５％、１０４％、１０３％、１０２％、または１０１％までの範囲内のウリジンジヌクレオチド含有量を有してもよい。

【０３０２】

以上の任意の実施形態では、修飾ＯＲＦは、少なくとも１つ、複数、または全てのウリジン位置において修飾ウリジンを含んでもよい。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、５位において、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルにより修飾された、ウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、１位において、例えば、ハロゲン、メチル

、またはエチルにより修飾された、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、またはこれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、修飾ウリジンは５－メトキシウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは５－ヨードウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンはシュードウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンはＮ１－メチル－シュードウリジンである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、シュードウリジンとＮ１－メチル－シュードウリジンとの組合せである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと５－メトキシウリジンとの組合せである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルシュードウリジンと５－メトキシウリジンとの組合せである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンとＮ１－メチル－シュードウリジンとの組合せである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、シュードウリジンと５－ヨードウリジンとの組合せである。一部の実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンと５－メトキシウリジンとの組合せである。

【０３０３】

一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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％はシュードウリジンである。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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－メチルシュードウリジンである。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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、かつ、残りの部分はＮ１－メチルシュードウリジンである。一部の実施形態では、本開示によるｍＲＮＡ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、かつ、残りの部分はＮ１－メチルシュードウリジンである。

【０３０４】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、構成的に発現されるｍＲＮＡなどの発現される哺乳動物ｍＲＮＡからの少なくとも１つのＵＴＲを含む。ｍＲＮＡは、健常な成体哺乳動物の少なくとも１つの組織において連続的に転写される場合に、哺乳動物において構成的に発現されると考えられる。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、構成的に発現される哺乳動物ｍＲＮＡなどの発現される哺乳動物ＲＮＡからの５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、または５’および３’ＵＴＲを含む。アクチンｍＲＮＡは、構成的に発現されるｍＲＮＡの例である。

【０３０５】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ヒドロキシステロイド１７－ベータデヒドロゲナーゼ４（ＨＳＤ１７Ｂ４またはＨＳＤ）からの少なくとも１つのＵＴＲ、例えば、ＨＳＤからの５’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、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、またはアフリカツメガエルベータグロビン（ＸＢＧ）ｍＲＮＡからの少なくとも１つのＵＴＲを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ＨＢＡ、ＨＢＢ、またはＸＢＧなどのグロビンｍＲＮＡからの５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、または５’および３’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、またはＸＢＧからの５’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、またはＸＢＧからの３’ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ウシ成長ホルモン、サイトメガロウイルス、マウスＨｂａ－ａ１、ＨＳＤ、アルブミン遺伝子、ＨＢＡ、ＨＢＢ、ＸＢＧ、熱ショックタンパク質９０（Ｈｓｐ９０）、グリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）、ベータアクチン、アルファ－チューブリン、腫瘍タンパク質（ｐ５３）、または上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）からの５’および３’ＵＴＲを含む。

【０３０６】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、同じ供給源、例えば、構成的に発現されるｍＲＮＡ、例えば、アクチン、アルブミン、またはグロビン、例えば、ＨＢＡ、ＨＢＢ、またはＸＢＧからの５’および３’ＵＴＲを含む。

【０３０７】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡは５’ＵＴＲ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。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、５’キャップと開始コドンとの間にＫｏｚａｋ配列（以下に記載される）を含むが、いかなる追加の５’ＵＴＲも有しない。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは３’ＵＴＲを含まず、例えば、終止コドンとポリＡテイルとの間に追加のヌクレオチドは存在しない。

【０３０８】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡはＫｏｚａｋ配列を含む。Ｋｏｚａｋ配列は、ｍＲＮＡから翻訳されるポリペプチドの翻訳開始および全体的な収率に影響することができる。Ｋｏｚａｋ配列は、開始コドンとして機能することができるメチオニンコドンを含む。最小のＫｏｚａｋ配列はＮＮＮＲＵＧＮであり、以下の少なくとも１つが当てはまる：最初のＮはＡまたはＧであり、かつ、２つ目のＮは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。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列は、ＲＮＮＲＵＧＮ、ＮＮＮＲＵＧＧ、ＲＮＮＲＵＧＧ、ＲＮＮＡＵＧＮ、ＮＮＮＡＵＧＧ、またはＲＮＮＡＵＧＧである。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はｒｃｃＲＵＧｇであり、これは０個のミスマッチまたは小文字の位置に対する最大１または２つのミスマッチを有する。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はｒｃｃＡＵＧｇであり、これは０個のミスマッチまたは小文字の位置に対する最大１または２つのミスマッチを有する。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（配列番号：２７７）であり、これは０個のミスマッチまたは小文字の位置に対する最大１、２、または３つのミスマッチを有する。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はｇｃｃＡｃｃＡＵＧであり、これは０個のミスマッチまたは小文字の位置に対する最大１、２、３、または４つのミスマッチを有する。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はＧＣＣＡＣＣＡＵＧである。一部の実施形態では、Ｋｏｚａｋ配列はｇｃｃｇｃｃＲｃｃＡＵＧＧ（配列番号：２７８）であり、これは０個のミスマッチまたは小文字の位置に対する最大１、２、３、または４つのミスマッチを有する。

【０３０９】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：１に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、

配列番号：１のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１０】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２４４に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２４４のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１１】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２５６に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２５６のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１２】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２５７に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２５７のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１３】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２５７に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２５８のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１４】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２５９に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２５９のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１５】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２６０に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２６０のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１６】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするＯＲＦを含むｍＲＮＡは、配列番号：２６１に対して少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、任意選択的に、配列番号：２６１のＯＲＦ（すなわち、配列番号：２０４）は、配列番号：２１０、２１４、２１５、２２３、２２４、２５０、２５２、２５４、２６５、または２６６のいずれか１つの代替的なＯＲＦにより置換されている。

【０３１７】

一部の実施形態では、配列番号２４３、２４４、または２５６～２６１の任意選択的に置換されている配列に対する同一性の程度は９５％である。一部の実施形態では、配列番号２４３、２４４、または２５６～２６１の任意選択的に置換されている配列に対する同一性の程度は９８％である。一部の実施形態では、配列番号２４３、２４４、または２５

６～２６１の任意選択的に置換されている配列に対する同一性の程度は９９％である。一部の実施形態では、配列番号２４３、２４４、または２５６～２６１の任意選択的に置換されている配列に対する同一性の程度は１００％である。

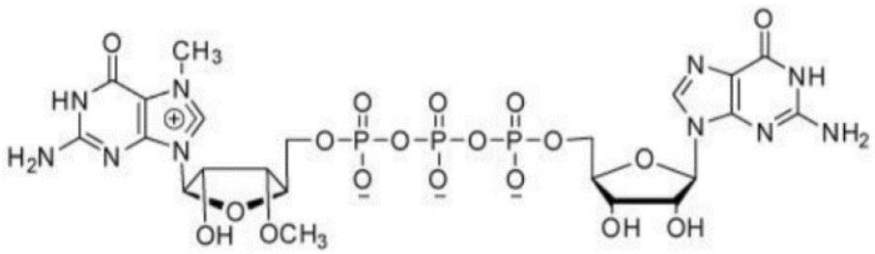
【０３１８】

一部の実施形態では、本明細書において開示されるｍＲＮＡは、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、またはＣａｐ２などの５’キャップを含む。５’キャップは、一般に、ｍＲＮＡの５’から３’方向の鎖の第１のヌクレオチド、すなわち、第１のキャップ隣接ヌクレオチドの５’位に５’三リン酸を通じて連結された７－メチルグアニンリボヌクレオチド（これは、例えばＡＲＣＡに関して以下に議論するように、さらに修飾されてもよい）である。Ｃａｐ０では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ隣接ヌクレオチドのリボースの両方は２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ１では、ｍＲＮＡの第１および第２の転写される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。Ｃａｐ２では、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ隣接ヌクレオチドのリボースの両方は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。ヒトｍＲＮＡなどの哺乳動物ｍＲＮＡなどのほとんどの内因性の高等真核生物ｍＲＮＡはＣａｐ１またはＣａｐ２を含む。Ｃａｐ０ならびにＣａｐ１およびＣａｐ２とは異なる他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の成分による「非自己」としての認識に起因して、ヒトなどの哺乳動物において免疫原性なことがあり、Ｉ型インターフェロンなどのサイトカインレベルの上昇を結果としてもたらし得る。ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５などの自然免疫系の成分はまた、Ｃａｐ１またはＣａｐ２以外のキャップを有するｍＲＮＡの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合することがあり、ｍＲＮＡの翻訳を阻害する可能性がある。

【０３１９】

キャップは、転写と同時に含めることができる。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆転キャップアナログ；Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＡＭ８０４５）は、開始時に転写物にｉｎ ｖｉｔｒｏで組み込むことができるグアニンリボヌクレオチドの５’位に連結された７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’三リン酸を含むキャップアナログである。ＡＲＣＡは、第１のキャップ隣接ヌクレオチドの２’位がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップを結果としてもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，（２００１）“Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｍＲＮＡｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ ‘ａｎｔｉ－ｒｅｖｅｒｓｅ’ ｃａｐ ａｎａｌｏｇｓ ７－ｍｅｔｈｙｌ（３’－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌ）ＧｐｐｐＧ ａｎｄ ７－ｍｅｔｈｙｌ（３’ｄｅｏｘｙ）ＧｐｐｐＧ，”ＲＮＡ ７：１４８６－１４９５を参照。ＡＲＣＡの構造を以下に示す。

【化１】

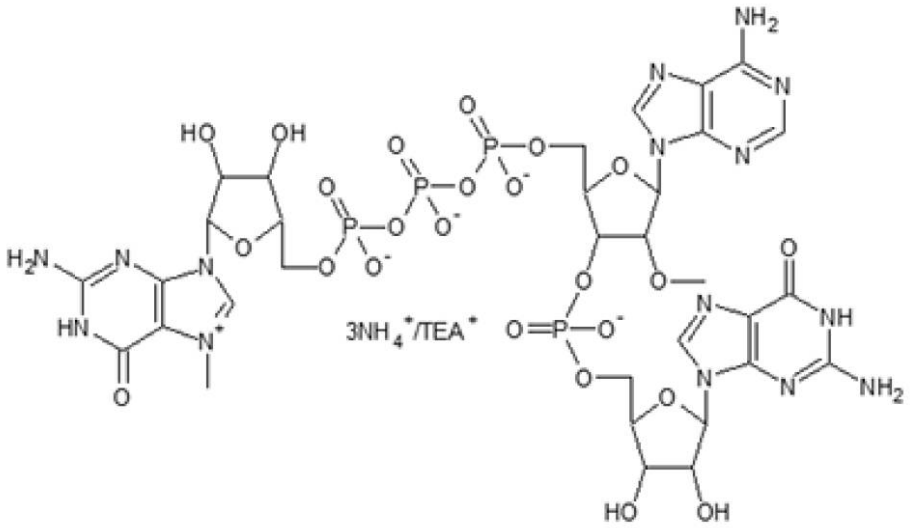


【０３２０】

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、転写と同時にＣａｐ１構造を提供することができる。３’－Ｏ－メチル化型のＣ

ｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧおよびＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧもまた、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。

【化２】




【０３２１】

あるいは、キャップは、ＲＮＡ転写後に付加されてもよい。例えば、ワクシニアキャッピング酵素が市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ、カタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、これは、そのＤ１サブユニットにより提供される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、ならびにそのＤ１２サブユニットにより提供されるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。そのため、それは、Ｓ－アデノシルメチオニンおよびＧＴＰの存在下で７－メチルグアニンをＲＮＡに付加して、Ｃａｐ０を与えることができる。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。キャップおよびキャップ形成アプローチの追加の議論について、例えば、ＷＯ２０１７／０５３２９７およびＩｓｈｉｋａｗａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ．（２００９）Ｎｏ．５３，１２９－１３０を参照。

【０３２２】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリＡ）テイルをさらに含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００個のアデニン、任意選択的に最大３００個のアデニンを含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００個のアデニンヌクレオチドを含む。一部の事例では、ポリＡテイルは、ポリＡテイル内の１つまたは複数の位置における１つまたは複数の非アデニンヌクレオチド「アンカー」により「割り込まれて」いる。ポリＡテイルは、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドを含んでもよいが、１つまたは複数の非アデニンヌクレオチドも含んでもよい。本明細書において使用される場合、「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、本明細書に記載されるｍＲＮＡ上のポリＡテイルは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするヌクレオチドまたは目的の配列の３’に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含んでもよい。一部の事例では、ｍＲＮＡ上のポリＡテイルは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするヌクレオチドまたは目的の配列の３’に位置する連続しない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、規則的または不規則な間隔でアデニンヌクレオチドに割り込んでいる。

【０３２３】

一部の実施形態では、１つまたは複数の非アデニンヌクレオチドは、連続するアデニンヌクレオチドに割り込むように配置されており、それにより、ポリ（Ａ）結合タンパク質は、連続するアデニンヌクレオチドのストレッチに結合することができる。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、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、かつ、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドが後続する。

【０３２４】

ポリＡテイルは、連続するアデニンヌクレオチドおよびそれに後続する１つまたは複数の非アデニンヌクレオチド、および任意選択的に、それに後続する追加のアデニンヌクレオチドの１つの配列を含んでもよい。

【０３２５】

一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１つの非アデニンヌクレオチドまたは２～１０個の非アデニンヌクレオチドの１つの連続するストレッチを含むまたは含有する。一部の実施形態では、（１つまたは複数の）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。一部の事例では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。

【０３２６】

一部の実施形態では、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。一部の事例では、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。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、非アデニンヌクレオチドはチミンヌクレオチドである。一部の事例では、１つより多くの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テイルは配列番号：４として提供される。

【０３２７】

一部の実施形態では、ｍＲＮＡはポリアデニル化（ポリＡ）テイルをさらに含む。一部の事例では、ポリＡテイルは、ポリＡテイル内の１つまたは複数の位置における１つまたは複数の非アデニンヌクレオチド「アンカー」により「割り込まれて」いる。ポリＡテイルは、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドを含んでもよいが、１つまたは複数の非アデニンヌクレオチドも含んでもよい。本明細書において使用される場合、「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、本明細書に記載されるｍＲＮＡ上のポリＡテイルは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするヌクレオチドまたは目的の配列の３’に位置する連続するアデニンヌクレオチドを含んでもよい。一部の事例では、ｍＲＮＡ上のポリＡテイルは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするヌクレオチドまたは目的の配列の３’に位置する連続しない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、規則的または不規則な

間隔でアデニンヌクレオチドに割り込んでいる。

【０３２８】

一部の実施形態では、１つまたは複数の非アデニンヌクレオチドは、連続するアデニンヌクレオチドに割り込むように配置されており、それにより、ポリ（Ａ）結合タンパク質は、連続するアデニンヌクレオチドのストレッチに結合することができる。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、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、かつ、少なくとも８個の連続するアデニンヌクレオチドが後続する。

【０３２９】

本発明のポリＡテイルは、連続するアデニンヌクレオチドおよびそれに後続する１つまたは複数の非アデニンヌクレオチド、および任意選択的に、それに後続する追加のアデニンヌクレオチドの１つの配列を含んでもよい。

【０３３０】

一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１つの非アデニンヌクレオチドまたは２～１０個の非アデニンヌクレオチドの１つの連続するストレッチを含むまたは含有する。一部の実施形態では、（１つまたは複数の）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。一部の事例では、１つまたは複数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。一部の実施形態では、１つまたは複数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。

【０３３１】

一部の実施形態では、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。一部の事例では、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。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、非アデニンヌクレオチドはチミンヌクレオチドである。一部の事例では、１つより多くの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テイルは、配列番号：４として提供される：

ＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＧＣＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＣＣＧＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡＡ

においてまたはその近くにおいて少なくとも１つの修飾残基を含む。一部の実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ＲＮＡの３’末端においてまたはその近くにおいて少なくとも１つの修飾残基を含む。

【０３３３】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、１、２、３またはより多くの修飾残基を含む。一部の実施形態では、修飾ｇＲＮＡ中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％）は修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

【０３３４】

非修飾核酸は、例えば、細胞内のヌクレアーゼまたは血清中に見出されるものにより、分解されやすいことがある。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することができる。したがって、一態様では、本明細書に記載されるｇＲＮＡは、例えば、細胞内または血清に基づくヌクレアーゼに対する安定性を導入するために、１つまたは複数の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含有することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載される修飾ｇＲＮＡ分子は、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｅｘ　ｖｉｖｏの両方において、細胞の集団中に導入された時に、低減された自然免疫応答を呈することができる。「自然免疫応答」という用語は、サイトカイン発現および放出、特にインターフェロン、ならびに細胞死の誘導を伴う、一本鎖核酸などの外因性核酸に対する細胞応答を含む。

【０３３５】

骨格修飾の一部の実施形態では、酸素の１つまたは複数を異なる置換基により置換することにより修飾残基のリン酸基を修飾することができる。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、非修飾リン酸部分の本明細書に記載されるような修飾リン酸基による大規模な置換を含むことができる。一部の実施形態では、リン酸骨格の骨格修飾は、非荷電性リンカーまたは非対称の電荷分布を有する荷電性リンカーのいずれかを結果としてもたらす変化を含むことができる。

【０３３６】

修飾リン酸基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノホスフェート、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ールホスホネートおよびリン酸トリエステルが挙げられる。非修飾リン酸基中のリン原子はアキラルである。しかしながら、上記の原子の１つまたは原子群による非ブリッジ形成性酸素の１つの置換は、リン原子をキラルとすることができる。不斉リン原子は、「Ｒ」配置（本明細書においてＲｐ）または「Ｓ」配置（本明細書においてＳｐ）のいずれかを有することができる。骨格はまた、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）によるブリッジ形成性酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の置換により修飾することができる。置換は、連結性酸素のいずれかまたは連結性酸素の両方において起こることができる。

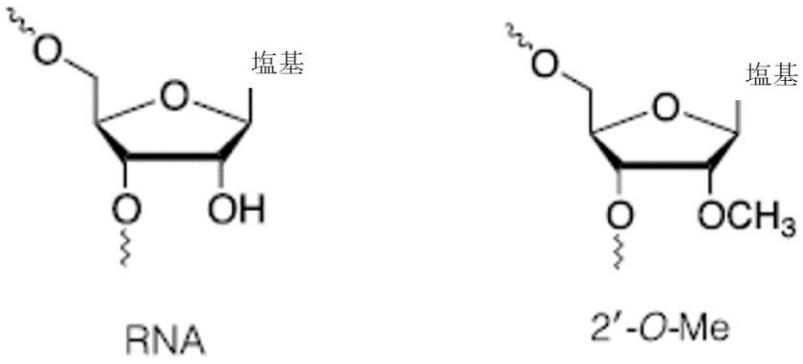
【０３３７】

リン酸基は、ある特定の骨格修飾における非リン含有接続因子により置換することができる。一部の実施形態では、荷電性リン酸基は、中性部分により置換することができる。リン酸基を置換することができる部分の例としては、例えば、メチルホスホネート、ヒドロキシアミノ、シロキサン、カルボネート、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ンカー、スルホネート、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、メチレンジメチルヒドラゾおよびメチレンオキシメチルイミノを挙げることができるがこれらに限定されない。

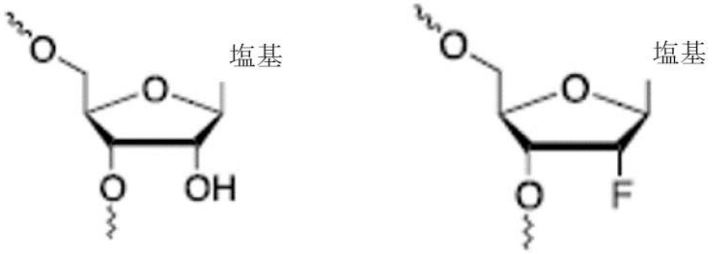
【０３３８】
核酸を模倣することができるスキャフォールドもまた構築することができ、該スキャフォールドでは、ホスフェートリンカーおよびリボース糖がヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドサロゲートにより置換されている。そのような修飾は、骨格および糖修飾を含んでもよい。一部の実施形態では、核酸塩基は、サロゲート骨格によりテザー連結され得る。例としては、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジンおよびペプチド核酸（ＰＮＡ）ヌクレオシドサロゲートを挙げることができるがこれらに限定されない。
【０３３９】
修飾ヌクレオシドおよび修飾ヌクレオチドは、糖の基、すなわち糖修飾において１つまたは複数の修飾を含むことができる。例えば、２’ヒドロキシル基（ＯＨ）を修飾、例えば、多数の異なる「オキシ」または「デオキシ」置換基により置換することができる。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基の修飾は、核酸の安定性を増進させることができ、その理由は、ヒドロキシルはもはや脱プロトン化されて２’－アルコキシドイオンを形成し得ないからである。
【０３４０】
２’ヒドロキシル基修飾の例としては、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ；「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）；ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（$CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$（Ｒは、例えば、Ｈまたは任意選択的に置換されているアルキルであり得、ｎは、０～２０（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）の整数であり得る））を挙げることができる。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は２’－フルオロ修飾であり得、これは、２’ヒドロキシル基をフッ化物により置換する。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、「ロックド」核酸（ＬＮＡ）を含むことができ、ＬＮＡでは、２’ヒドロキシルは、例えば、$C_{1\sim6}$アルキレンまたは$C_{1\sim6}$ヘテロアルキレン架橋により、同じリボース糖の４’炭素に接続されていてもよく、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（アミノは、例えば、$NH_2$；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、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得）およびアミノアルコキシ、Ｏ（$CH_2)_n$－アミノ（アミノは、例えば、$NH_2$；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、またはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、またはポリアミノであり得）を挙げることができる。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、「アンロックド」核酸（ＵＮＡ）を含むことができ、ＵＮＡでは、リボース環はＣ２’－Ｃ３’結合を欠いている。一部の実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基（ＭＯＥ）、（$OCH_2CH_2OCH_3$、例えば、ＰＥＧ誘導体）を含むことができる。
【０３４１】
「デオキシ」２’修飾としては、水素（すなわち、例えば、部分的にｄｓＲＮＡのオーバーハング部分における、デオキシリボース糖）；ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）；アミノ（アミノは、例えば、$NH_2$；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）；$NH(CH_2CH_2NH)_nCH2CH_2$－アミノ（アミノは、例えば、本明細書に記載されるようなものであり得る）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（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（これらは、任意選択的に、例えば、本明細書に記載されるようなアミノに

より、置換されていてもよい）を挙げることができる。
【０３４２】
糖修飾は、リボース中の対応する炭素とは反対の立体化学配置を有する１つまたは複数の炭素も含有してもよい糖の基を含むことができる。したがって、修飾核酸は、例えば糖としてアラビノースを含有するヌクレオチドを含むことができる。修飾核酸はまた、脱塩基糖を含むことができる。これらの脱塩基糖はまた、構成糖原子の１つまたは複数においてさらに修飾され得る。修飾核酸はまた、Ｌ型の１つまたは複数の糖、例えば、Ｌ－ヌクレオシドを含むことができる。
【０３４３】
修飾核酸に組み込むことができる、本明細書に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むことができる。核酸塩基の例としては、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）が挙げられるがこれらに限定されない。これらの核酸塩基は、修飾または全体的に置換されて、修飾核酸に組み込むことができる修飾残基を提供することができる。ヌクレオチドの核酸塩基は、プリン、ピリミジン、プリンアナログ、またはピリミジンアナログから独立して選択することができる。一部の実施形態では、核酸塩基は、例えば、塩基の天然に存在するおよび合成の誘導体を含むことができる。
【０３４４】
デュアルガイドＲＮＡを用いる実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒａｃｒ　ＲＮＡのそれぞれは、修飾を含有することができる。そのような修飾は、ｃｒＲＮＡおよび／またはｔｒａｃｒ　ＲＮＡの一方または両方の末端にあってもよい。ｓｇＲＮＡを含む実施形態では、ｓｇＲＮＡの一方もしくは両方の末端における１つもしくは複数の残基は化学的に修飾されていてもよく、またはｓｇＲＮＡ全体は化学的に修飾されていてもよい。ある特定の実施形態は５’末端修飾を含む。ある特定の実施形態は３’末端修飾を含む。ある特定の実施形態では、ガイドＲＮＡ分子の一本鎖オーバーハング中のヌクレオチドの１つまたは複数または全てはデオキシヌクレオチドである。
【０３４５】
一部の実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、２０１６年１２月８日に出願された「Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｇｕｉｄｅ　ＲＮＡｓ」という名称のＵＳ　６２／４３１，７５６（その内容は参照することにより全体が本明細書に組み込まれる）に開示された修飾パターンの１つを含む。
【０３４６】
一部の実施形態では、本発明は、１つまたは複数の修飾を含むｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、修飾は２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾はヌクレオチド間の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で修飾された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通りに表すことができる。

【化３】

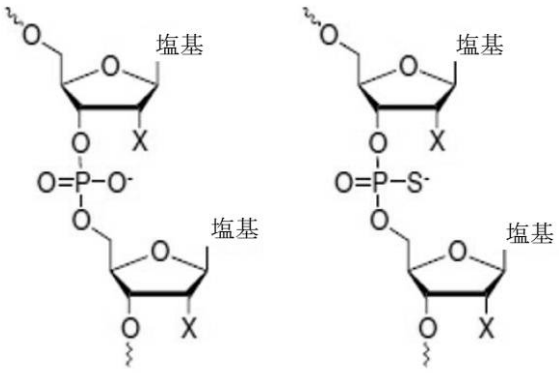



【０３４９】
ヌクレオチドの糖環に影響を及ぼすことが示されている別の化学修飾はハロゲン置換である。例えば、ヌクレオチドの糖環上の２’－フルオロ（２’－Ｆ）置換は、オリゴヌクレオチドの結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。
【０３５０】
本出願において、「ｆＡ」、「ｆＣ」、「ｆＵ」、または「ｆＧ」という用語は、２’－Ｆで置換されたヌクレオチドを表すために使用され得る。
【０３５１】
２’－Ｆの置換は以下の通りに表すことができる。
【化４】




【０３５２】
ホスホロチオエート（ＰＳ）連結または結合は、硫黄が、例えばヌクレオチド塩基間の結合において、ホスホジエステル連結中の１つの非架橋性リン酸酸素を置換している結合を指す。ホスホロチオエートが使用され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。
【０３５３】
「＊」は、ＰＳ修飾を表すために使用され得る。本出願において、Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊、またはＧ＊という用語は、ＰＳ結合により次（例えば、３’）のヌクレオチドに連結されたヌクレオチドを表すために使用され得る。
【０３５４】
本出願において、「ｍＡ＊」、「ｍＣ＊」、「ｍＵ＊」、または「ｍＧ＊」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅにより置換されており、かつＰＳ結合により次（例えば、３’）のヌクレオチドに連結されたヌクレオチドを表すために使用され得る。
【０３５５】
以下の図解は、非架橋性リン酸酸素へのＳの置換を示し、これは、ホスホジエステル結合の代わりにＰＳ結合を生成する。

【化５】



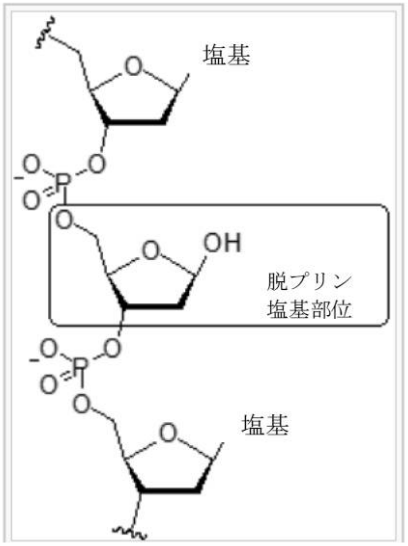

ホスホジエステル　　ホスホロチオエート(PS)

RNA の天然の
ホスホジエステル連結　　修飾ホスホロチオエート(PS)
結合

【０３５６】

脱塩基ヌクレオチドは、含窒素塩基を欠いたヌクレオチドを指す。以下の図は、塩基を欠いた脱塩基（脱プリン塩基としても公知）部位を有するオリゴヌクレオチドを表す。

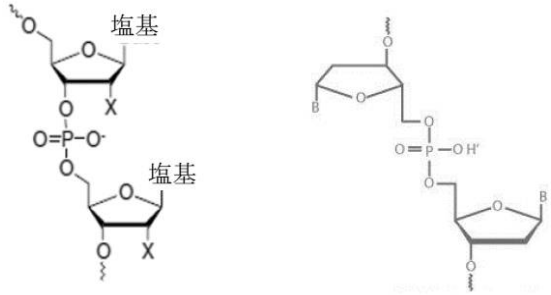
【化６】




【０３５７】

逆位塩基は、通常の５’から３’への連結から反転した連結（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）を有する塩基を指す。例えば、

【化７】




通常の
オリゴヌクレオチド連結　　反転した
オリゴヌクレオチド連結

【０３５８】

脱塩基ヌクレオチドを逆位連結を用いて取り付けることができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’から５’への連結を介して末端５’ヌクレオチドに取り付けられてもよく、または、脱塩基ヌクレオチドは、３’から３’への連結を介して末端３’ヌクレオチドに取り付けられてもよい。末端５’または３’ヌクレオチドのいずれかにおける逆位脱塩基ヌクレオチドは、逆位脱塩基末端キャップとも呼ばれ得る。

【０３５９】

一部の実施形態では、５’端における最初の３、４、または５つのヌクレオチドの１つまたは複数、および３’端における最後の３、４、または５つのヌクレオチドの１つまたは複数は修飾されている。一部の実施形態では、修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、逆位脱塩基ヌクレオチド、ＰＳ結合、または安定性および／もしく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】

一部の実施形態では、５’端における最初の４つのヌクレオチド、および３’端における最後の４つのヌクレオチドは、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合により連結されている。

【０３６１】

一部の実施形態では、５’端における最初の３つのヌクレオチド、および３’端における最後の３つのヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、５’端における最初の３つのヌクレオチド、および３’端における最後の３つのヌクレオチドは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、５’端における最初の３つのヌクレオチド、および３’端における最後の３つのヌクレオチドは、逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。

【０３６２】

一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは修飾ｓｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ｓｇＲＮＡは、配列番号：３に示す修飾パターンを含み、Ｎは任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、かつ、Ｎの全体は、ヌクレアーゼを標的配列に方向付けるガイド配列を含む。

【０３６３】

一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号：８７～１２４のいずれか１つに示すｓｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つおよび配列番号：１２５のヌクレオチドを含むｓｇＲＮＡを含み、配列番号：１２５のヌクレオチドはガイド配列の３’末端にあり、かつ、ガイド配列は、配列番号：３に示すように修飾されていてもよい。

【０３６４】

Ｃ．リボ核タンパク質複合体

一部の実施形態では、表１からの１つもしくは複数のガイド配列を含む１つもしくは複数のｇＲＮＡまたは表２からの１つもしくは複数のｓｇＲＮＡおよびＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えばヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９などのＣａｓヌクレアーゼを含む組成物が包含される。一部の実施形態では、コードされるＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得るクリベース活性を有する。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はＣａｓヌクレアーゼを含む。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの例としては、Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）、Ｓ．アウレウス（S. aureus）、および他の原核生物（例えば、次の段落中のリストを参照）のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣａｓ９ヌクレアーゼ、ならびにこれらの改変（例えば、操作または突然変異体）型が挙げられる。例えば、ＵＳ２０１６／０３１２１９８　Ａ１；ＵＳ　２０１６／０３１２１９９　Ａ１を参照。Ｃａｓヌクレアーゼの他の例としては、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムのＣｓｍもしくはＣｍｒ複合体またはそのＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、もしくはＣｍｒ２サブユニット；およびＩ型ＣＲＩＳＰＲシステム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。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩＡ型、ＩＩＢ型、またはＩＩＣ型システムからのものであってもよい。様々なＣＲＩＳＰＲシステムおよびＣａ

ｓヌクレアーゼの議論について、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。

【０３６５】

Ｃａｓヌクレアーゼが由来し得る非限定的な例示的な種としては、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）、ストレプトコッカス属菌（Streptococcus sp.）、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）、リステリア・イノキュア（Listeria innocua）、ラクトバチルス・ガセリ（Lactobacillus gasseri）、フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）、ウォリネラ・サクシノゲネス（Wolinella succinogenes）、サテレラ・ワズワーセンシス（Sutterella wadsworthensis）、ガンマプロテオバクテリウム（Gammaproteobacterium）、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）、カンピロバクター・ジェジュニ（Campylobacter jejuni）、パスツレラ・ムルトシダ（Pasteurella multocida）、フィブロバクター・サクシノゲネス（Fibrobacter succinogene）、ロドスピリルム・ラブラム（Rhodospirillum rubrum）、ノカルジオプシス・ダソンビレイ（Nocardiopsis dassonvillei）、ストレプトミセス・プリスチナスピラリス（Streptomyces pristinaespiralis）、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネス（Streptomyces viridochromogenes）、ストレプトミセス・ビリドクロモゲネス（Streptomyces viridochromogenes）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（Streptosporangium roseum）、ストレプトスポランギウム・ロセウム（Streptosporangium roseum）、アリシクロバチルス・アシドカルダリウス（Alicyclobacillus acidocaldarius）、バチルス・シュードミコイデス（Bacillus pseudomycoides）、バチルス・セレニチレデュセンス（Bacillus selenitireducens）、エキシグオバクテリウム・シビリカム（Exiguobacterium sibiricum）、ラクトバチルス・デルブルエッキー（Lactobacillus delbrueckii）、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius）、ラクトバチルス・ブクネリ（Lactobacillus buchneri）、トレポネーマ・デンチコラ（Treponema denticola）、ミクロシラ・マリナ（Microscilla marina）、バークホルデリア目（Burkholderiales）細菌、ポラロモナス・ナフタレニボランス（Polaromonas naphthalenivorans）、ポラロモナス属菌（Polaromonas sp.）、クロコスファエラ・ワトソニー（Crocosphaera watsonii）、シアノテセ属菌（Cyanothece sp.）、ミクロシスチス・エルギノーサ（Microcystis aeruginosa）、シネココッカス属菌（Synechococcus sp.）、アセトハロビウム・アラバチカム（Acetohalobium arabaticum）、アンモニフェクス・デジェンシー（Ammonifex degensii）、カルディセルロシルプター・ベシー（Caldicelulosiruptor becscii）、カンジダツス・デスルフォルディス（Candidatus Desulforudis）、クロストリジウム・ボツリヌム（Clostridium botulinum）、クロストリジウム・ディフィシル（Clostridium difficile）、フィネゴルディア・マグナ（Finegoldia magna）、ナトラナエロビウス・サーモフィラス（Natranaerobius thermophilus）、ペロトマクラム・サーモプロピオニカム（Pelotomaculum thermopropionicum）、アシディチオバチルス・カルダス（Acidithiobacillus caldus）、アシディチオバチルス・フェロオキシダンス（Acidithiobacillus ferrooxidans）、アロクロマチウム・ビノスム（Allochromatium vinosum）、マリノバクター属菌（Marinobacter sp.）、ニトロソコッカス・ハロフィルス（Nitrosococcus halophilus）、ニトロソコッカス・ワトソニー（Nitrosococcus watsoni）、シュードアルテロモナス・ハロプランクティス（Pseudoalteromonas haloplanktis）、クテドノバクター・ラセミフェル（Ktedonobacter racemifer）、メタノハロビウム・エベスチガータム（Methanohalobium evestigatum）、アナベナ・バリアビリス（Anabaena variabilis）、ノドゥラリア・スプミゲナ（Nodularia spumigena）、ノストク属菌（Nostoc sp.）、アルスロスピラ・マキシマ（Arthrospira maxima）、アルスロスピラ・プラテンシス（Arthrospira platensis）、アルスロスピラ属菌（Arthrospira sp.）、リングビア属菌（Lyngbya sp.）

、ミクロコレウス・クソノプラステス（Microcoleus chthonoplastes）、オシラトリア属菌（Oscillatoria sp.）、ペトロトガ・モビリス（Petrotoga mobilis）、サーモシフォ・アフリカヌス（Thermosipho africanus）、ストレプトコッカス・パスツリアヌス（Streptococcus pasteurianus）、ナイセリア・シネレア（Neisseria cinerea）、カンピロバクター・ラリ（Campylobacter lari）、パルビバクラム・ラバメンティボランス（Parvibaculum lavamentivorans）、コリネバクテリウム・ジフテリア（Corynebacterium diphtheria）、アシドアミノコッカス属菌（Acidaminococcus sp.）、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌ＮＤ２００６、およびアカリオクロリス・マリナ（Acaryochloris marina）が挙げられる。

【０３６６】

一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ナイセリア・メニンギチジス（Neisseria meningitidis）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、スタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）のＣａｓ９ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、アシドアミノコッカス属菌（Acidaminococcus sp.）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌ＮＤ２００６のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。さらなる実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、フランシセラ・ツラレンシス（Francisella tularensis）、ラクノスピラセアエ（Lachnospiraceae）細菌、ブチリビブリオ・プロテオクラスチカス（Butyrivibrio proteoclasticus）、ペレグリニバクテリア（Peregrinibacteria）細菌、パルクバクテリア（Parcubacteria）細菌、スミセラ（Smithella）、アシドアミノコッカス（Acidaminococcus）、カンジダツス・メタノプラズマ・テルミツム（Candidatus Methanoplasma termitum）、ユーバクテリウム・エリゲンス（Eubacterium eligens）、モラクセラ・ボボクリ（Moraxella bovoculi）、レプトスピラ・イナダイ（Leptospira inadai）、ポルフィロモナス・クレビオリカニス（Porphyromonas crevioricanis）、プレボテラ・ディシエンス（Prevotella disiens）、またはポルフィロモナス・マカカエ（Porphyromonas macacae）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。ある特定の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、アシドアミノコッカス属（Acidaminococcus）またはラクノスピラセアエ属（Lachnospiraceae）のＣｐｆ１ヌクレアーゼである。

【０３６７】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤と共にあるｇＲＮＡはリボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）と呼ばれる。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はＣａｓヌクレアーゼである。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼと共にあるｇＲＮＡはＣａｓ　ＲＮＰと呼ばれる。一部の実施形態では、ＲＮＰは、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型成分を含む。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからのタンパク質である。一部の実施形態では、Ｃａｓ９と共にあるｇＲＮＡはＣａｓ９　ＲＮＰと呼ばれる。

【０３６８】

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。一部の実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、１つより多くのＲｕｖＣドメインおよび／または１つより多くのＨＮＨドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は野生型Ｃａｓ９である。組成物、使用、および方法の実施形態のそれぞれにおいて、Ｃａｓは標的ＤＮＡ中の二本鎖切断を誘導する。

【０３６９】

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。Ｒ

ｕｖＣ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。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは、１つより多くのＲｕｖＣドメインおよび／または１つより多くのＨＮＨドメインを含む。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ヌクレアーゼは野生型Ｃａｓ９である。一部の実施形態では、Ｃａｓ９は、標的ＤＮＡ中の二本鎖切断を誘導することができる。ある特定の実施形態では、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クリベースおよびニッカーゼ活性のいずれも有しなくてもよい。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。開始コドン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：２０４として提供される。融合タンパク質中に含めるために好適な例示的なＣａｓ９　ｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１０として提供される。

【０３７０】

一部の実施形態では、キメラＣａｓヌクレアーゼが使用され、該キメラＣａｓヌクレアーゼでは、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部分により置換されている。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１などの異なるヌクレアーゼからのドメインで置換されていてもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、改変されたヌクレアーゼであってもよい。

【０３７１】

他の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからのものであってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムのカスケード複合体の成分であってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは Ｃａｓ３タンパク質であってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムからのものであってもよい。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは ＲＮＡ切断活性を有してもよい。

【０３７２】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、１つのＤＮＡ鎖を切断して、「ニック」としても公知の一本鎖切断を生成することができる。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はＣａｓニッカーゼを含む。ニッカーゼは、ｄｓＤＮＡ中にニックを作製する、すなわち、ＤＮＡ二重らせんの１つの鎖を切断するが他方を切断しない酵素である。一部の実施形態では、Ｃａｓニッカーゼは、エンドヌクレアーゼ切断活性部位が、例えば触媒ドメイン中の１つまたは複数の変化（例えば、点突然変異）により、不活性化されているバージョンのＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上記で議論したＣａｓヌクレアーゼ）である。例えば、Ｃａｓニッカーゼおよび例示的な触媒ドメインの変化の議論について米国特許第８，８８９，３５６号明細書を参照。一部の実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼなどのＣａｓニッカーゼは、不活性化されたＲｕｖＣまたはＨＮＨドメインを有する。例示的なＣａｓ９ニッカーゼのアミノ酸配列は配列番号：２０６として提供される。開始コドンおよび終止コドンを含む例示的なＣａｓ９ニッカーゼｍＲＮＡ　ＯＲＦ配列は配列番号：２０７として提供される。融合タンパク質に含めるために好適な例示的なＣａｓ９ニッカーゼｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１１として提供される。

【０３７３】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つのみの機能的なヌクレアーゼドメインを含有するように改変される。例えば、剤のタンパク質は、ヌクレアーゼドメインの１つが突然変異または全体的もしくは部分的に欠失してその核酸切断活性を低減させるように改変されていてもよい。一部の実施形態では、低減した活性を有するＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、不活性のＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、低減した活性を有するＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。一部の実施形態では、不活性のＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。

【０３７４】

一部の実施形態では、Ｃａｓタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存されたアミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または変化させるように置換されている。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン中のアミノ酸置換を含んでもよい。ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ１０Ａ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１５） Ｃｅｌｌ Ｏｃｔ ２２：１６３（３）： ７５９－７７１を参照。一部の実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン中のアミノ酸置換を含んでもよい。ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８３Ａ、およびＤ９８６Ａ（Ｓ．ピオゲネス（S. pyogenes）Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ ｅｔ ａｌ．（２０１５）を参照。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、およびＤ１２５５Ａ（フランシセラ・ノビシダ（Francisella novicida）Ｕ１１２ Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ － Ａ０Ｑ７Ｑ２（ＣＰＦ１＿ＦＲＡＴＮ）に基づく）が挙げられる。

【０３７５】

一部の実施形態では、ニッカーゼをコードするｍＲＮＡが、標的配列のセンスおよびアンチセンス鎖にそれぞれ相補的な一対のガイドＲＮＡと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドＲＮＡは、ニッカーゼを標的配列に方向付け、標的配列の反対鎖にニックを生成すること（すなわち、二重ニック形成）によりＤＳＢを導入する。一部の実施形態では、二重ニック形成の使用は、特異性を向上させかつオフターゲット効果を低減させ得る。一部の実施形態では、ニッカーゼは、ＤＮＡの反対鎖を標的化して標的ＤＮＡ中に二重ニックを生成する２つの別々のガイドＲＮＡと共に使用される。一部の実施形態では、ニッカーゼは、近接して標的ＤＮＡ中に二重ニックを生成するように選択される２つの別々のガイドＲＮＡと共に使用される。

【０３７６】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリベースおよびニッカーゼ活性を欠いている。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤はｄＣａｓ ＤＮＡ結合ポリペプチドを含む。ｄＣａｓポリペプチドは、ＤＮＡ結合活性を有すると共に、触媒（クリベース／ニッカーゼ）活性を本質的に欠いている。一部の実施形態では、ｄＣａｓポリペプチドはｄＣａｓ９ポリペプチドである。一部の実施形態では、クリベースおよびニッカーゼ活性を欠いたＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはｄＣａｓ ＤＮＡ結合ポリペプチドは、そのエンドヌクレアーゼ切断活性部位が、例えばその触媒ドメイン中の１つまたは複数の変化（例えば、点突然変異）により、不活性化されているバージョンのＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上記で議論したＣａｓヌクレアーゼ）である。例えば、ＵＳ２０１４／０１８６９５８Ａ１；ＵＳ２０１５／０１６６９８０Ａ１を参照。例示的なｄＣａｓ９アミノ酸配列は配列番号：２０８として提供される。開始コドン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：２０９として提供される。融合タンパク質に含めるために好適な例示的なＣａｓ９ ｍＲＮＡコーディング配列は配列番号：２１２として提供される。

【０３７７】

一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つまたは複数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）。

【０３７８】

一部の実施形態では、異種機能ドメインは、細胞の核へのＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の輸送を促進してもよい。例えば、異種機能ドメインは核局在シグナル（ＮＬＳ）であってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つのＮＬＳと融合していてもよい。１つのＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮ

Ａ結合剤配列のＮ末端またはＣ末端において連結されてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃ末端において少なくとも１つのＮＬＳに融合していてもよい。ＮＬＳはまた、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤配列内に挿入されてもよい。他の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つより多くのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２、３、４、または５つのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２つのＮＬＳと融合していてもよい。ある特定の状況では、２つのＮＬＳは、同じ（例えば、２つのＳＶ４０　ＮＬＳ）または異なってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、カルボキシ末端において連結された２つのＳＶ４０　ＮＬＳ配列に融合している。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２つのＮＬＳと融合していてもよく、１つはＮ末端において、および１つはＣ末端において連結していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、３つのＮＬＳと融合していてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＮＬＳと融合していなくてもよい。一部の実施形態では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号：２７４）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号：２７５）などの単節型配列であってもよい。一部の実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラスミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号：２７６）などの双節型配列であってもよい。特定の実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号：２７４）のＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端において連結していてもよい。１つまたは複数のリンカーが任意選択的に融合部位に含められる。一部の実施形態では、先行する実施形態のいずれかによる１つまたは複数の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つまたは複数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。

【０３７９】

一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞内半減期を改変できるものであってもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期は増加されてもよい。一部の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期は低減されてもよい。一部の実施形態では、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ものであってもよい。一部の実施形態では、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ものであってもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解用のシグナルペプチドとして作用してもよい。一部の実施形態では、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、またはカルパインプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素により媒介されてもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＰＥＳＴ配列を含んでもよい。一部の実施形態では、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り修飾されてもよい。一部の実施形態では、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）としても公知）、ユビキチン関連修飾因子１（ＵＲＭ１）、神経前駆細胞発現、発生的にダウンレギュレートされたタンパク質８（ｎｅｕｒｏｎａｌ－ｐｒｅｃｕｒｓｏｒ－ｃｅｌｌ－ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌｌｙ　ｄｏｗｎｒｅｇｕｌａｔｅｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ－８；ＮＥＤＤ８；Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）においてＲｕｂ１とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原Ｆ結合型（ｈｕｍａｎ　ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ　Ｆ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ；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）、膜アンカー型ＵＢＬ（ＭＵＢ）、ユビキチンフォールド修飾因子１（ＵＦＭ１）、およびユビキチン様タンパク質５（ＵＢＬ５）が挙げられる。

【０３８０】

一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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　ｍｏｎｏｍｅｒ、ｍＣｈｅｒｒｙ、ｍＲＦＰ１、ＤｓＲｅｄ－Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＤｓＲｅｄ２、ＤｓＲｅｄ－Ｍｏｎｏｍｅｒ、ＨｃＲｅｄ－Ｔａｎｄｅｍ、ＨｃＲｅｄ１、ＡｓＲｅｄ２、ｅｑＦＰ６１１、ｍＲａｓｂｅｒｒｙ、ｍＳｔｒａｗｂｅｒｒｙ、Ｊｒｅｄ）、および橙色蛍光タンパク質（ｍＯｒａｎｇｅ、ｍＫＯ、Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、Ｍｏｎｏｍｅｒｉｃ　Ｋｕｓａｂｉｒａ－Ｏｒａｎｇｅ、ｍＴａｎｇｅｒｉｎｅ、ｔｄＴｏｍａｔｏ）または任意の他の好適な蛍光タンパク質が挙げられる。他の実施形態では、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ー精製（ＴＡＰ）タグ、ｍｙｃ、ＡｃＶ５、ＡＵ１、ＡＵ５、Ｅ、ＥＣＳ、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キャリアタンパク質（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、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（ＣＡＴ）、ベータガラクトシダーゼ、ベータグルクロニダーゼ、ルシフェラーゼ、または蛍光タンパク質が挙げられる。

【０３８１】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を特定の細胞小器官、細胞種、組織、または臓器に標的化してもよい。一部の実施形態では、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てもよい。

【０３８２】

さらなる実施形態では、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方向付けられる場合、例えば、ＣａｓヌクレアーゼがｇＲＮＡにより標的配列に方向付けられる場合、エフェクタードメインは標的配列を修飾しまたは標的配列に影響してもよい。一部の実施形態では、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、または転写リプレッサードメインから選択されてもよい。一部の実施形態では、異種機能ドメインは、ＦｏｋＩヌクレアーゼなどのヌクレアーゼである。例えば、米国特許第９，０２３，６４９号明細書を参照。一部の実施形態では、異種機能ドメインは転写活性化因子またはリプレッサーである。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 ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔ

ｙ 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。そのため、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方向付けられて結合できる転写因子となる。

【０３８３】

Ｄ．ｇＲＮＡの有効性の決定

一部の実施形態では、ｇＲＮＡの有効性は、ＲＮＰを形成する他の成分と共に送達または発現された時に決定される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼと共に発現される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼを既に安定的に発現する細胞株中に送達されまたは該細胞株中で発現される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＰの部分として細胞に送達される。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ＣａｓヌクレアーゼなどのガイドヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと共に細胞に送達される。

【０３８４】

本明細書に記載されるように、本明細書において開示されるＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼおよびガイドＲＮＡの使用は、ＤＮＡ中に二本鎖切断をもたらすことができ、該二本鎖切断は、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）突然変異の形態でエラーを生成することができる。インデルに起因する多くの突然変異は、リーディングフレームを変化させまたは未熟な終止コドンを導入し、したがって、非機能的タンパク質を産生する。

【０３８５】

一部の実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルに基づいて決定される。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルは、Ｃａｓ９を安定的に発現するＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９）である。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルはＨＵＨ７ヒト肝細胞癌細胞である。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルはＨｅｐＧ２細胞である。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルは初代ヒト肝細胞である。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデルは初代カニクイザル肝細胞である。初代ヒト肝細胞の使用に関して、市販の初代ヒト肝細胞を使用して、実験間のより大きな一貫性を提供することができる。一部の実施形態では、欠失または挿入がｉｎ ｖｉｔｒｏモデル（例えば、初代ヒト肝細胞）において起こるオフターゲット部位の数は、例えば、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＣａｓ９ ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解析することにより決定される。一部の実施形態では、そのような決定は、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＣａｓ９ ｍＲＮＡ、ガイドＲＮＡ、およびドナーオリゴヌクレオチドをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞からのゲノムＤＮＡを解析することを含む。そのような決定のための例示的な手順は、以下の実施例において提供される。

【０３８６】

一部の実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、ｇＲＮＡ選択プロセスについて複数のｉｎ ｖｉｔｒｏ細胞モデルにわたり決定される。一部の実施形態では、選択されたｇＲＮＡを用いたデータの細胞株比較が行われる。一部の実施形態では、複数の細胞モデルにおけるクロススクリーニングが行われる。

【０３８７】

一部の実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、ｉｎ ｖｉｖｏモデルに基づいて決定される。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｖｏモデルは齧歯動物モデルである。一部の実施形態では、齧歯動物モデルは、突然変異体ヒトＴＴＲ遺伝子であってもよいヒトＴＴＲ遺伝子を発現するマウスである。一部の実施形態では、ｉｎ ｖｉｖｏモデルは非ヒト

霊長動物、例えばカニクイザルである。

【０３８８】

一部の実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＴＴＲの編集パーセントにより測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの編集パーセントは、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏモデルの場合に細胞培養培地中、またはｉｎ　ｖｉｖｏモデルの場合に血清もしくは組織中で、ＴＴＲタンパク質のノックダウンを達成する（ａｃｈｅｉｖｅ）ために必要な編集パーセントと比較される。

【０３８９】

一部の実施形態（ｅｍｂｏｄｉｅｍｅｎｔｓ）では、ガイドＲＮＡの有効性は、標的細胞種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／または頻度により測定される。一部の実施形態では、細胞集団中でおよび／または標的部位におけるインデル生成の頻度と比べて非常に低い頻度（例えば、＜５％）でオフターゲット部位においてインデルを生成する有効なガイドＲＮＡが提供される。したがって、本開示は、標的細胞種（例えば、肝細胞）においてオフターゲットインデル形成を呈しない、または細胞集団中でおよび／もしくは標的部位におけるインデル生成の頻度と比べて＜５％のオフターゲットインデル形成の頻度を生成するガイドＲＮＡを提供する。一部の実施形態では、本開示は、標的細胞種（例えば、肝細胞）においていかなるオフターゲットインデル形成も呈しないガイドＲＮＡを提供する。一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載される１つまたは複数の方法により評価されるような、５つ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が提供される。一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載される１つまたは複数の方法により評価されるような、４、３、２、もしくは１つ未満のまたは４、３、２、もしくは１つに等しい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が提供される。一部の実施形態では、（１つまたは複数の）オフターゲット部位は、標的細胞（例えば、肝細胞）ゲノム中のタンパク質コーディング領域において起こらない。

【０３９０】

一部の実施形態では、標的ＤＮＡ中の挿入／欠失（「インデル」）突然変異の形成および相同組換え修復（ＨＤＲ）事象などの遺伝子編集事象の検出は、タグ化プライマーを用いる線形増幅およびタグ化増幅生成物を単離することを利用する（本明細書において以後、「ＬＡＭ－ＰＣＲ」、または「線形増幅（ＬＡ）」方法と称する）。

【０３９１】

一部の実施形態では、方法は、二本鎖切断（ＤＳＢ）を起こすように誘導され、かつ任意選択的に、ＤＳＢを修復するためにＨＤＲ鋳型を提供された細胞から細胞ＤＮＡを単離すること；タグ化プライマーを用いて少なくとも１サイクルのＤＮＡの線形増幅を行うこと；タグを含む線形増幅生成物を単離し、それにより、非タグ化プライマーを用いて増幅された任意の増幅生成物を廃棄すること；任意選択的に、単離された生成物をさらに増幅すること；および線形増幅生成物、またはさらなる増幅生成物を分析して、例えば、標的ＤＮＡ中の二本鎖切断、挿入、欠失、またはＨＤＲ鋳型配列などの編集事象の存在または非存在を決定することを含む。一部の事例では、編集事象は定量化され得る。本明細書において使用される定量化など（ＨＤＲおよび非ＨＤＲ編集事象、例えばインデルの状況におけるものを含む）は、集団中の編集事象の頻度および／または（１つもしくは複数の）種類を検出することを含む。

【０３９２】

一部の実施形態では、１サイクルのみの線形増幅が実行される。

【０３９３】

一部の事例では、タグ化プライマーは分子バーコードを含む。一部の実施形態では、タグ化プライマーは分子バーコードを含み、かつ、１サイクルのみの線形増幅が実行される。

【０３９４】

一部の実施形態では、分析ステップは、線形増幅生成物またはさらなる増幅生成物をシ

ークエンシングすることを含む。シークエンシングは、次世代シークエンシング、ならびにプラスミドに線形増幅生成物またはさらなる増幅生成物をクローニングすることおよびプラスミドまたはプラスミドの部分をシークエンシングすることなどの、当業者に公知の任意の方法を含んでもよい。他の態様では、分析ステップは、線形増幅生成物またはさらなる増幅生成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）を行うことを含む。他の事例では、分析ステップは、線形増幅生成物またはさらなる増幅生成物を、ＨＤＲ鋳型配列を含むＤＮＡを同定するように設計された核酸プローブと接触させることおよび（１つもしくは複数の）線形増幅生成物または（１つもしくは複数の）さらなる増幅生成物に結合したプローブを検出することを含む。一部の実施形態では、方法は、標的ＤＮＡ中のＨＤＲ鋳型の位置を決定することをさらに含む。

【０３９５】

ある特定の実施形態では、方法は、標的ＤＮＡ中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鋳型が標的ＤＮＡ中に組み込まれた位置であり、かつ、挿入部位は、一部の標的ＤＮＡ配列および一部のＨＤＲ鋳型配列を含んでもよい。

【０３９６】

一部の実施形態では、タグ化プライマーを用いる標的ＤＮＡの線形増幅は、１～５０サイクル、１～６０サイクル、１～７０サイクル、１～８０サイクル、１～９０サイクル、または１～１００サイクルにわたり行われる。

【０３９７】

一部の実施形態では、タグ化プライマーを用いる標的ＤＮＡの線形増幅は、ＤＮＡデュプレックスを分離するための変性ステップ、プライマーを結合させるためのアニーリングステップ、および伸長ステップを含む。一部の実施形態では、線形増幅は等温で行われる（温度の変化を必要としない）。一部の実施形態では、等温線形増幅は、ループ媒介性等温増幅（ＬＡＭＰ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、ヘリカーゼ依存性増幅、またはニッキング酵素増幅反応である。

【０３９８】

一部の実施形態では、タグ化プライマーは、予測される編集事象位置、例えば、挿入、欠失、または鋳型挿入部位から少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１１０、少なくとも１２０、少なくとも１３０、少なくとも１４０、少なくとも１５０、少なくとも１６０、少なくとも１７０、少なくとも１８０、少なくとも１９０、少なくとも２００、少なくとも２１０、少なくとも２２０、少なくとも２３０、少なくとも２４０、少なくとも２５０、少なくとも２６０、少なくとも２７０、少なくとも２８０、少なくとも２９０、少なくとも３００、少なくとも１，０００、少なくとも５，０００、または少なくとも１０，０００ヌクレオチド離れて標的ＤＮＡにアニールする。

【０３９９】

一部の実施形態では、タグ化プライマーは分子バーコードを含む。一部の実施形態では、分子バーコードは、標的ＤＮＡに相補的でない配列を含む。一部の実施形態では、分子バーコードは、６、８、１０、または１２個のヌクレオチドを含む。

【０４００】

一部の実施形態では、プライマー上のタグは、ビオチン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ＤＮＡ配列、またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）である。

【０４０１】

一部の実施形態では、（１つまたは複数の）線形増幅生成物は、プライマー上のタグに特異的な捕捉試薬を使用して単離される。一部の実施形態では、捕捉試薬は、ビーズ、固体支持体、マトリックス、またはカラム上にある。一部の実施形態では、単離ステップは、（１つまたは複数の）線形増幅生成物をプライマー上のタグに特異的な捕捉試薬と接触させることを含む。一部の実施形態では、捕捉試薬は、ビオチン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ＤＮＡ配列、またはフルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）である。

【０４０２】
一部の実施形態では、タグはビオチンであり、かつ、捕捉試薬はストレプトアビジンである。一部の実施形態では、タグはストレプトアビジンであり、かつ、捕捉試薬はビオチンである。一部の実施形態では、タグはプライマーの５’端、プライマーの３’端、またはプライマーの内部にある。一部の実施形態では、タグおよび／または捕捉試薬は、単離ステップ後に除去される。一部の実施形態では、タグおよび／または捕捉試薬は除去されず、かつ、さらなる増幅および分析ステップが、タグおよび／または捕捉の存在下で行われる。
【０４０３】
一部の実施形態では、さらなる増幅は、非線形である。一部の実施形態では、さらなる増幅は、デジタルＰＣＲ、ｑＰＣＲ、またはＲＴ－ＰＣＲである。一部の実施形態では、シークエンシングは次世代シークエンシング（ＮＧＳ）である。
【０４０４】
一部の実施形態では、標的ＤＮＡは、ゲノムまたはミトコンドリアのＤＮＡである。一部の実施形態では、標的ＤＮＡは、原核細胞または真核細胞のゲノムＤＮＡである。一部の実施形態では、標的ＤＮＡは哺乳動物ＤＮＡである。標的ＤＮＡは、非分裂細胞または分裂細胞からのものであってもよい。一部の実施形態では、標的ＤＮＡは、初代細胞からのものであってもよい。一部の実施形態では、標的ＤＮＡは、複製細胞からのものである。
【０４０５】
一部の事例では、細胞ＤＮＡは、線形増幅前にせん断される。一部の実施形態では、せん断されたＤＮＡは、０．５ｋｂ～２０ｋｂの平均サイズを有する。一部の事例では、細胞ＤＮＡは、０．５、０．７５、１．０、１．２５、１．５、１．７５、２．０、２．２５、２．５、２．７５、３．０、３．２５、３．５、３．７５、４．０、４．２５、４．５、４．７５、５．０、５．２５、５．５、５．７５、６．０、６．２５、６．５、６．７５、７．０、７．２５、７．５、７．７５、８．０、８．２５、８．５、８．７５、９．０、９．２５、９．５、９．７５、１０．０、１０．２５、１０．５、１０．７５、１１．０、１１．２５、１１．５、１１．７５、１２．０、１２．２５、１２．５、１２．７５、１３．０、１３．２５、１３．５、１３．７５、１４．０、１４．２５、１４．５、１４．７５、１５．０、１５．２５、１５．５、１５．７５、１６．０、１６．２５、１６．５、１６．７５、１７．０、１７．２５、１７．５、１７．７５、１８．０、１８．２５、１８．５、１８．７５、１９．０、１９．２５、１９．５、１９．７５、または２０．０ｋｂの平均サイズにせん断される。一部の事例では、細胞ＤＮＡは、約１．５ｋｂの平均サイズにせん断される。
【０４０６】
一部の実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＴＴＲの分泌により測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの分泌は、細胞培養培地または血清を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを使用して測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの分泌は、編集を測定するために使用される同じｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏのシステムまたはモデルにおいて測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの分泌は、初代ヒト肝細胞において測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの分泌は、ＨＵＨ７細胞において測定される。一部の実施形態では、ＴＴＲの分泌は、ＨｅｐＧ２細胞において測定される。
【０４０７】
ＥＬＩＳＡアッセイは一般に当業者に公知であり、血清ＴＴＲレベルを決定するために設計することができる。一つの例示的な実施形態では、血液が収集され、血清が単離される。Ｍｏｕｓｅ Ｐｒｅａｌｂｕｍｉｎ（Ｔｒａｎｓｔｈｙｒｅｔｉｎ）ＥＬＩＳＡ Ｋｉｔ（Ａｖｉｖａ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｃａｔ．ＯＫＩＡ００１１１）またはヒトＴＴＲを測定するための類似のキットを使用して総ＴＴＲ血清レベルが決定されてもよい。キットが入手できない場合、測定しているＴＴＲに特異的な捕捉抗体を予備コ

ーティングしたプレートを使用してＥＬＩＳＡを開発することができる。プレートは次に、ある期間にわたり室温でインキュベートされた後、洗浄される。酵素－抗ＴＴＲ抗体コンジュゲートが加えられ、インキュベートされる（ｉｎｎｃｕｂａｔｅｄ）。未結合の抗体コンジュゲートが除去され、プレートが洗浄された後、酵素と反応する（ｒｅａｃｔｅｓ）発色基質溶液が添加される。使用される酵素および基質に特異的な吸光度において適切なプレートリーダーでプレートが読み取られる。

【０４０８】

一部の実施形態では、（組織からのものなどの）細胞中のＴＴＲの量によりｇＲＮＡの有効性が測定される。一部の実施形態では、細胞中のＴＴＲの量は、ウエスタンブロットを使用して測定される。一部の実施形態では、使用される細胞はＨＵＨ７細胞である。一部の実施形態では、使用される細胞は初代ヒト肝細胞である。一部の実施形態では、使用される細胞は、動物から得られる初代（ｐｒｉｍａｒ）細胞である。一部の実施形態では、ＴＴＲの量は、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（ハウスキーピング遺伝子）の量と比較される。

【０４０９】

ＩＩＩ．ＬＮＰ配合物およびＡＴＴＲの治療

一部の実施形態では、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：５～８２のいずれか１つもしくは複数のガイド配列、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むガイド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。一部の実施形態では、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つまたは複数を含むｇＲＮＡが投与されて、ＴＴＲ遺伝子中にＤＳＢが誘導される。ガイドＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡもしくはベクターと共に投与されてもよい。

【０４１０】

一部の実施形態では、ＴＴＲ遺伝子を改変する方法であって、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むガイド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。一部の実施形態では、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡが投与されて、ＴＴＲ遺伝子が改変される。ガイドＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡもしくはベクターと共に投与されてもよい。

【０４１１】

一部の実施形態では、ＡＴＴＲを治療する方法であって、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むガイド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。一部の実施形態では、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡが投与されて、ＡＴＴＲが治療される。ガイドＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡもしくはベクターと共に投与されてもよい。

【０４１２】

一部の実施形態では、ＴＴＲの血清濃度を低減させる方法であって、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むガイドＲＮＡを投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複

数または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡが投与されて、アミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積が低減または予防される。ｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡもしくはベクターと共に投与されてもよい。

【０４１３】

一部の実施形態では、対象のアミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積を低減させまたは予防する方法であって、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数、または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むガイド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。一部の実施形態では、対象のアミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積を低減させまたは予防する方法であって、配列番号：８７～１１３のｓｇＲＮＡのいずれか１つまたは複数を含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、配列番号：５～８２のガイド配列のいずれか１つもしくは複数または配列番号：８７～１２４のｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡが投与されて、アミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積が低減または予防される。ｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼまたはＣａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡもしくはベクターと共に投与されてもよい。

【０４１４】

一部の実施形態では、表１のガイド配列または表２からの１つもしくは複数のｓｇＲＮＡを含むｇＲＮＡは、Ｃａｓヌクレアーゼなどの ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼと共に、ＤＳＢを誘導し、かつ、修復の間の非相同末端結合（ＮＨＥＪ）は、ＴＴＲ遺伝子中の突然変異をもたらす。一部の実施形態では、ＮＨＥＪは、（１つまたは複数の）ヌクレオチドの欠失または挿入をもたらし、該欠失または挿入は、ＴＴＲ遺伝子中のフレームシフトまたはナンセンス突然変異を誘導する。

【０４１５】

一部の実施形態では、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）本発明のガイドＲＮＡを投与することは、対象におけるＴＴＲのレベル（例えば、血清レベル）を低減させ、したがって、アミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積および凝集を予防する。

【０４１６】

一部の実施形態では、対象のアミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積を低減させまたは予防することは、胃、結腸、または神経組織などの対象の１つまたは複数の組織中のＴＴＲの沈着を低減させまたは予防することを含む。一部の実施形態では、神経組織は坐骨神経または後根神経節を含む。一部の実施形態では、ＴＴＲの沈着は、胃、結腸、後根神経節、および坐骨神経の２、３、または４つにおいて低減される。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。一部の実施形態では、対象のアミロイドもしくはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積を低減させもしくは予防することおよび／またはＴＴＲの沈着を低減させもしくは予防することは、ある期間にわたり血清ＴＴＲレベルを低減させることに基づいて推測される。実施例において議論するように、本明細書において提供される方法および使用により血清ＴＴＲレベルを低減させることは、例えば、組成物の投与の８週後に測定される、上記および実施例において議論するものなどの組織からの沈着したＴＴＲのクリアランスを結果としてもたらすことができることが発見された。

【０４１７】

一部の実施形態では、対象は哺乳動物である。一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、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。

【０４１８】

一部の実施形態では、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、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１におけるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２からの１つもしくは複数のｓｇＲＮＡを含むガイドＲＮＡの使用が提供される。

【０４１９】

一部の実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、および配合物は静脈内に投与される。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、および配合物は肝臓循環中に投与される。

【０４２０】

一部の実施形態では、本明細書において提供されるガイドＲＮＡを含む組成物の単回投与は、突然変異体タンパク質の発現をノックダウンするために充分である。一部の実施形態では、本明細書において提供されるガイドＲＮＡを含む組成物の単回投与は、細胞の集団中の突然変異体タンパク質の発現をノックアウトするために充分である。他の実施形態では、ガイドＲＮＡを含む本明細書において提供される組成物の１回より多くの投与は、累積効果を介して編集を最大化するために有益であり得る。例えば、本明細書において提供される組成物は、２、３、４、５、またはより多くの回数、例えば２回投与することができる。投与は、例えば、１日～２年、例えば、１～７日、７～１４日、１４日～３０日、３０日～６０日、６０日～１２０日、１２０日～１８３日、１８３日～２７４日、２７４日～３６６日、または３６６日～２年の範囲内の期間により分離され得る。

【０４２１】

一部の実施形態では、組成物は、０．０１～１０ｍｇ／ｋｇ（ｍｐｋ）、例えば、０．０１～０．１ｍｐｋ、０．１～０．３ｍｐｋ、０．３～０．５ｍｐｋ、０．５～１ｍｐｋ、１～２ｍｐｋ、２～３ｍｐｋ、３～５ｍｐｋ、５～１０ｍｐｋ、または０．１、０．２、０．３、０．５、１、２、３、５、もしくは１０ｍｐｋの範囲内の有効量で投与される。

【０４２２】

一部の実施形態では、本発明の組成物を用いた治療の有効性は、送達の１年、２年、３年、４年、５年、または１０年後に見られる。一部の実施形態では、本発明の組成物を用いた治療の有効性は、治療の前および後のＴＴＲの血清レベルを測定することにより評価される。一部の実施形態では、ＴＴＲの血清レベルの低減を介して評価される組成物を用いた治療の有効性は、１週、２週、３週、４週、２か月、３か月、４か月、５か月、６か月、７か月、８か月、９か月、１０か月、または１１か月時に見られる。

【０４２３】

一部の実施形態では、治療は、疾患進行を緩慢化または停止させる。

【０４２４】

一部の実施形態では、治療は、ＦＡＰの進行を緩慢化または停止させる。一部の実施形態では、治療は、感覚運動性ニューロパチーまたは自律性ニューロパチーの症状の改善、安定化、または変化の緩慢化を結果としてもたらす。

【０４２５】

一部の実施形態では、治療は、ＦＡＣの症状の改善、安定化、または変化の緩慢化を結果としてもたらす。一部の実施形態では、治療は、拘束型心筋症または鬱血性心不全の症状の改善、安定化、または変化の緩慢化を結果としてもたらす。

【０４２６】

一部の実施形態では、治療の有効性は、対象の生存期間の増加により測定される。

【０４２７】

一部の実施形態では、治療の有効性は、感覚運動性または自律性ニューロパチーの症状の改善または進行の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、身体領域を動かすか、または任意の身体領域を知覚する能力の増加または減少の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、嚥下し、呼吸し、腕、手、脚、もしくは足を使用し、または歩行する能力の改善または減少の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、神経痛の改善または進行の緩慢化により測定される

。一部の実施形態では、神経痛は、疼痛、灼熱感、ヒリヒリ感、または異常な感覚により特徴付けられる。一部の実施形態では、治療の有効性は、起立性低血圧、めまい、胃腸運動障害、膀胱機能障害、または性機能障害の改善または増加の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、虚弱の改善または進行の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、筋電図、神経伝導検査、または患者報告アウトカムを使用して測定される。

【０４２８】

一部の実施形態では、治療の有効性は、鬱血性心不全またはＣＨＦの症状の改善または進行の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、息切れ、呼吸困難、疲労、または足首、足、脚、腹部、もしくは頸静脈における腫脹の減少または増加の緩慢化により測定される。一部の実施形態では、治療の有効性は、身体中の液体構成の改善または進行の緩慢化により測定され、これは、体重増加、頻尿、または夜間咳などの指標により評価されてもよい。一部の実施形態では、治療の有効性は、心臓バイオマーカー検査（例えば、Ｂ型ナトリウム利尿ペプチド［ＢＮＰ］もしくはＮ末端プロｂ型ナトリウム利尿ペプチド［ＮＴ－ｐｒｏＢＮＰ］）、肺機能検査、胸部Ｘ線、または心電図記録法を使用して測定される。

【０４２９】

Ａ．併用療法

一部の実施形態では、本発明は、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つを、ＡＴＴＲの症状を軽減するために好適な追加の療法と共に含む併用療法を含む。

【０４３０】

一部の実施形態では、ＡＴＴＲのための追加の療法は、感覚運動性または自律性ニューロパチーの治療である。一部の実施形態では、感覚運動性または自律性ニューロパチーの治療は、非ステロイド性抗炎症性薬物、抗うつ剤、抗痙攣薬、抗不整脈薬（ａｎｔｉａｒｒｙｔｈｍｉｃ　ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎ）、または麻酔剤である。一部の実施形態では、抗うつ剤は、三環系（ｔｒｉｃｙｌｉｃ）剤またはセロトニン－ノルエピネフリン再取込み阻害剤である。一部の実施形態では、抗うつ剤は、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。一部の実施形態では、抗痙攣剤は、ガバペンチン、プレガバリン、トピラマート、またはカルバマゼピンである。一部の実施形態では、感覚運動性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。

【０４３１】

一部の実施形態では、ＡＴＴＲのための追加の療法は、拘束型心筋症または鬱血性心不全（ＣＨＦ）の治療である。一部の実施形態では、ＣＨＦのための治療は、ＡＣＥ阻害剤、アルドステロンアンタゴニスト、アンギオテンシン受容体遮断薬、ベータ遮断薬、ジゴキシン、利尿剤、または二硝酸イソソルビド／ヒドララジン塩酸塩である。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、アンギオテンシン受容体遮断薬は、アジルサルタン、カンデサルタン（ｃａｄｅｓａｒｔａｎ）、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。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、利尿剤は、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、トラセミド、アミロライド、またはトリアムテレン（ｔｒｉａｍｅｔｅｒｅｎｅ）である。

【０４３２】

一部の実施形態では、併用療法は、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮ

Ａのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つを、ＴＴＲまたは突然変異体ＴＴＲを標的化するｓｉＲＮＡと共に含む。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、野生型または突然変異体ＴＴＲの発現をさらに低減させまたは除去することができる任意のｓｉＲＮＡである。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡは薬物パティシラン（ＡＬＮ－ＴＴＲ０２）またはＡＬＮ－ＴＴＲｓｃ０２である。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つの後に投与される。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、本明細書において提供されるｇＲＮＡ組成物のいずれかを用いた治療後に定期的に投与される。

【０４３３】

一部の実施形態では、併用療法は、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つを、ＴＴＲまたは突然変異体ＴＴＲを標的化するアンチセンスヌクレオチドと共に含む。一部の実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、野生型または突然変異体ＴＴＲの発現をさらに低減させまたは除去することができる任意のアンチセンスヌクレオチドである。一部の実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは薬物イノテルセン（ＩＯＮＳ－ＴＴＲ$_{Rx}$）である。一部の実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つの後に投与される。一部の実施形態では、アンチセンスヌクレオチドは、本明細書において提供されるｇＲＮＡ組成物のいずれかを用いた治療後に定期的に投与される。

【０４３４】

一部の実施形態では、併用療法は、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つを、正しくフォールディングした四量体形態のＴＴＲの速度論的安定化を促進する小分子安定化剤と共に含む。一部の実施形態では、小分子安定化剤は、薬物タファミジス（ビンダケル（登録商標））またはジフルニサルである。一部の実施形態では、小分子安定化剤は、（例えば、本明細書において提供される組成物中の）表１に開示されるガイド配列のいずれか１つもしくは複数または表２におけるｓｇＲＮＡのいずれか１つもしくは複数を含むｇＲＮＡのいずれか１つの後に投与される。一部の実施形態では、小分子安定化剤は、本明細書において提供されるｇＲＮＡ組成物のいずれかを用いた治療後に定期的に投与される。

【０４３５】

Ｂ．ｇＲＮＡ組成物の送達

一部の実施形態では、本明細書に記載されるガイドＲＮＡ組成物は、単独でまたは１つもしくは複数のベクター上にコードされて、脂質ナノ粒子中に配合されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、２０１７年３月３０日に出願された「ＬＩＰＩＤ ＮＡＮＯＰＡＲＴＩＣＬＥ ＦＯＲＭＵＬＡＴＩＯＮＳ ＦＯＲ ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ ＣＯＭＰＯＮＥＮＴＳ」という名称のＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０２４９７３（その内容は参照することにより全体が本明細書に組み込まれる）を参照。ヌクレオチドを対象に送達できることが当業者に公知の任意の脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）が、本明細書に記載されるガイドＲＮＡの他に、ＣａｓもしくはＣａｓ９などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、またはＣａｓもしくはＣａｓ９タンパク質自体などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼのいずれかと共に利用されてもよい。

【０４３６】

ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓカーゴなどの ＲＮＡ用のＬＮＰ配合物の様々な実施形態が本明細書において開示される。そのようなＬＮＰ配合物は、（ｉ）ＣＣＤ脂質、例えばアミン脂質、（ｉｉ）中性脂質、（ｉｉｉ）ヘルパー脂質、および（ｉｖ）ステルス脂質、例えばＰＥＧ脂質を含んでもよい。ＬＮＰ配合物の一部の実施形態は、ヘルパー脂質、中性脂質

、およびステルス脂質、例えばＰＥＧ脂質と共に、「アミン脂質」を含む。「脂質ナノ粒子」は、分子間力により互いに物理的に会合した複数（すなわち、１つより多く）の脂質分子を含む粒子を意味する。

【０４３７】

ＣＣＤ脂質

【０４３８】

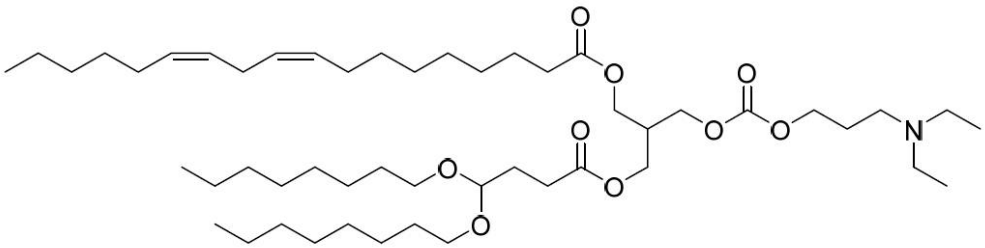
ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡ成分の肝細胞への送達用の脂質組成物はＣＣＤ脂質を含む。

【０４３９】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＡであり、リピドＡは、（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－ジエノエートであり、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－ジエノエートとも呼ばれる。リピドＡは以下の通りに表すことができる：

【０４４０】

【化８】



【０４４１】

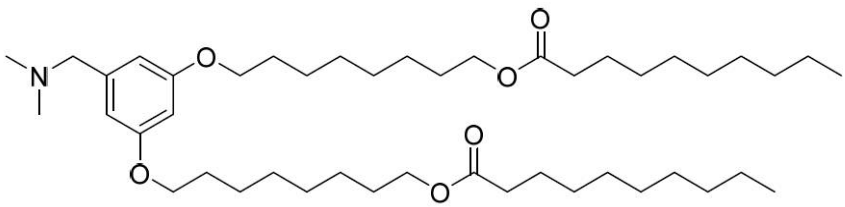
リピドＡは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば、第８４～８６頁）にしたがって合成されてもよい。

【０４４２】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＢであり、リピドＢ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（デカノエート）であり、（（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（デカノエート）とも呼ばれる。リピドＢは以下の通りに表すことができる：

【０４４３】

【化９】



【０４４４】

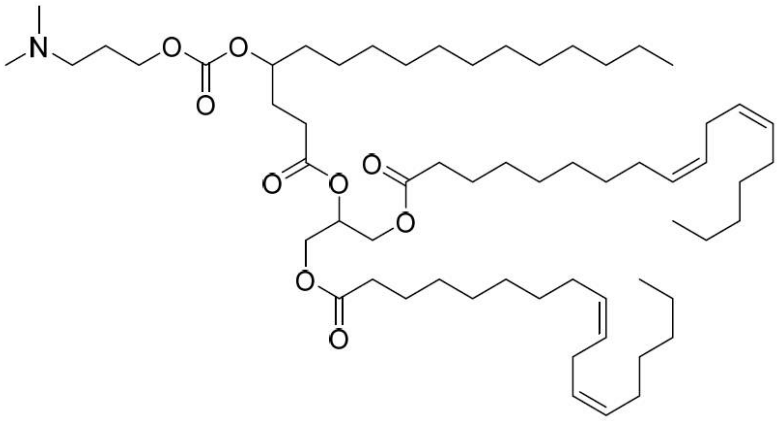
リピドＢは、ＷＯ２０１４／１３６０８６（例えば、第１０７～０９頁）にしたがって合成されてもよい。

【０４４５】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＣであり、リピドＣ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－ジエノエート）である。リピドＣは以下の通りに表すことができる：

【化１０】



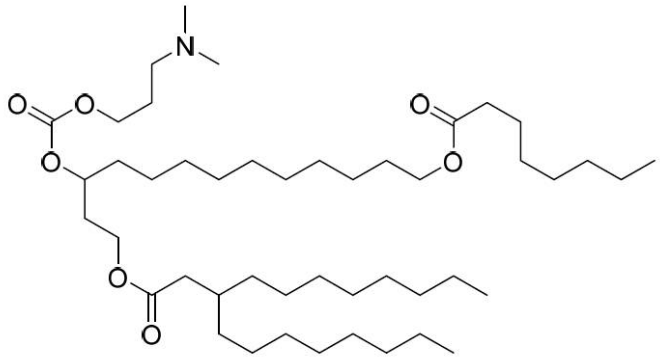
【０４４６】

一部の実施形態では、ＣＣＤ脂質はリピドＤであり、リピドＤ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エートである。

【０４４７】

リピドＤは以下の通りに表すことができる：

【化１１】



【０４４８】

リピドＣおよびリピドＤは、ＷＯ２０１５／０９５３４０にしたがって合成されてもよい。

【０４４９】

ＣＣＤ脂質はまた、リピドＡ、リピドＢ、リピドＣ、またはリピドＤの均等物であり得る。ある特定の実施形態では、ＣＣＤ脂質は、リピドＡの均等物、リピドＢの均等物、リピドＣの均等物、またはリピドＤの均等物である。

【０４５０】

アミン脂質

【０４５１】

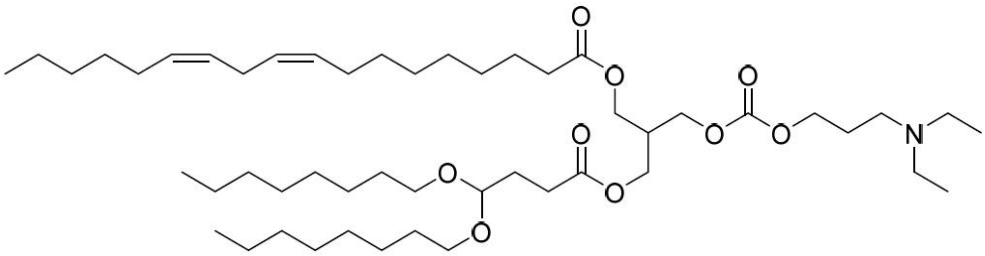
一部の実施形態では、生物活性剤の送達用のＬＮＰ組成物は「アミン脂質」を含み、アミン脂質は、リピドＡ、リピドＢ、リピドＣ、リピドＤまたはリピドＡの均等物（リピドＡのアセタールアナログなど）、リピドＢの均等物、リピドＣの均等物、およびリピドＤの均等物として定義される。

【０４５２】

一部の実施形態では、アミン脂質はリピドＡであり、リピドＡは、（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－ジエノエートであり、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－ジエノエートとも呼ばれる。リピドＡは以下の通りに表すことができる：

【化１２】



【０４５３】

リピドＡは、ＷＯ２０１５／０９５３４０（例えば、第８４～８６頁）にしたがって合成されてもよい。ある特定の実施形態では、アミン脂質はリピドＡの均等物である。

【０４５４】

ある特定の実施形態では、アミン脂質はリピドＡのアナログである。ある特定の実施形態では、リピドＡアナログはリピドＡのアセタールアナログである。特定のＬＮＰ組成物では、アセタールアナログはＣ４～Ｃ１２アセタールアナログである。一部の実施形態では、アセタールアナログはＣ５～Ｃ１２アセタールアナログである。追加の実施形態では、アセタールアナログはＣ５～Ｃ１０アセタールアナログである。さらなる実施形態では、アセタールアナログは、Ｃ４、Ｃ５、Ｃ６、Ｃ７、Ｃ９、Ｃ１０、Ｃ１１、およびＣ１２アセタールアナログから選択される。

【０４５５】

本明細書に記載されるＬＮＰにおいて使用するために好適なアミン脂質は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて生分解性である。アミン脂質は低い毒性を有する（例えば、１０ｍｇ／ｋｇより多いまたは１０ｍｇ／ｋｇに等しい量で有害効果なしに動物モデルにおいて忍容される）。ある特定の実施形態では、アミン脂質を含むＬＮＰとしては、アミン脂質の少なくとも７５％が、８、１０、１２、２４、もしくは４８時間、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿からクリアランスされるものが挙げられる。ある特定の実施形態では、アミン脂質を含むＬＮＰとしては、ｍＲＮＡまたはｇＲＮＡの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、もしくは４８時間、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿からクリアランスされるものが挙げられる。ある特定の実施形態では、アミン脂質を含むＬＮＰとしては、例えば、脂質（例えば、アミン脂質）、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、または他の成分を測定することにより、ＬＮＰの少なくとも５０％が、８、１０、１２、２４、もしくは４８時間、または３、４、５、６、７、もしくは１０日以内に血漿からクリアランスされるものが挙げられる。ある特定の実施形態では、ＬＮＰの脂質封入型の脂質、ＲＮＡ、または核酸成分がこれらの遊離型に対して測定される。

【０４５６】

脂質クリアランスは、文献に記載され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。例えば、Ｍａｉｅｒでは、ルシフェラーゼ標的化ｓｉＲＮＡを含有するＬＮＰ－ｓｉＲＮＡシステムが、側尾静脈を介する静脈内ボーラス注射により０．３ｍｇ／ｋｇで６～８週齢の雄Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに投与された。血液、肝臓、および脾臓試料が、投与の０．０８３、０．２５、０．５、１、２、４、８、２４、４８、９６、および１６８時間後に回収された。マウスが生理食塩水で灌流された後、組織回収物および血液試料を処理して血漿が得られた。全ての試料が処理され、ＬＣ－ＭＳにより分析された。さらに、Ｍａｉｅｒは、ＬＮＰ－ｓｉＲＮＡ配合物の投与後に毒性を評価するための手順を記載している

。例えば、ルシフェラーゼ標的化ｓｉＲＮＡが、雄スプラーグドーリーラットに５ｍＬ／ｋｇの投与体積で単回の静脈内ボーラス注射を介して０、１、３、５、および１０ｍｇ／ｋｇ（５動物／群）で投与された。２４時間後、意識のある動物の頸静脈から約１ｍＬの血液が得られ、血清が単離された。投与の７２時間後に、全ての動物を検死のために安楽死させた。臨床徴候、体重、血清化学、臓器重量および病理組織学の評価が行われた。ＭａｉｅｒはｓｉＲＮＡ－ＬＮＰ配合物を評価する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、および毒性を評価するために適用されてもよい。

【０４５７】

アミン脂質は、クリアランス速度の増加をもたらす。一部の実施形態では、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、アミン脂質が血液、血清、または血漿からクリアランスされる速度である。一部の実施形態では、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、または血漿からクリアランスされる速度である。一部の実施形態では、クリアランス速度は、ＬＮＰが血液、血清、または血漿からクリアランスされる速度である。一部の実施形態では、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クリアランスされる速度である。ある特定の実施形態では、高い速度のクリアランス速度は、実質的な有害効果を有しない安全性プロファイルをもたらす。アミン脂質は、循環中および組織中のＬＮＰ蓄積を低減させる。一部の実施形態では、循環中および組織中のＬＮＰ蓄積の低減は、実質的な有害効果を有しない安全性プロファイルをもたらす。

【０４５８】

本開示のアミン脂質は、それを含む媒体のｐＨに応じてイオン化可能であってもよい。例えば、弱酸性の媒体中で、アミン脂質はプロトン化されて正電荷を有してもよい。反対に、例えば、ｐＨが約７．３５である血液などの弱塩基性の媒体中で、アミン脂質はプロトン化されずに電荷を有しなくてもよい。一部の実施形態では、本開示のアミン脂質は、少なくとも約９のｐＨにおいてプロトン化されてもよい。一部の実施形態では、本開示のアミン脂質は、少なくとも約９のｐＨにおいてプロトン化されてもよい。一部の実施形態では、本開示のアミン脂質は、少なくとも約１０のｐＨにおいてプロトン化されてもよい。

【０４５９】

アミン脂質が電荷を有する能力は、その内在性のｐＫａに関する。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６．２の範囲内のｐＫａを有してもよい。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の範囲内のｐＫａを有してもよい。約５．１～約７．４の範囲内のｐＫａを有する陽イオン性脂質は、例えば肝臓への、ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるカーゴの送達のために効果的であることが見出されているので、これは有利であり得る。さらに、約５．３～約６．４の範囲内のｐＫａを有する陽イオン性脂質は、例えば腫瘍への、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける送達のために効果的であることが見出されている。例えば、ＷＯ２０１４／１３６０８６を参照。

【０４６０】

追加の脂質

【０４６１】

本開示の脂質組成物において使用するために好適な「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の脂質が挙げられる。本開示において使用するために好適な中性リン脂質の例としては、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）、ホスホコリン（ｐｏｈｓｐｈｏｃｈｏｌｉｎｅ）（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（ｄｉｌａｕｒｙｌｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｃ

ｈｏｌｉｎｅ）（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（ＰＭＰＣ）、１－パルミトイル－２－ステアロイルホスファチジルコリン（ＰＳＰＣ）、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－ジエイコセノイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホコリン（ＤＥＰＣ）、パルミトイルオレオ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、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジリノレオ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）、パルミトイルオレオ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合せが挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、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てもよい。別の実施形態では、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）であってもよい。

【０４６２】

「ヘルパー脂質」としては、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挙げられる。本開示において使用するために好適なヘルパー脂質としては、コレステロール、５－ヘプタデシルレソルシノール、およびコレステロールヘミスクシネートが挙げられるがこれらに限定されない。一実施形態では、ヘルパー脂質はコレステロールであってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質はコレステロールヘミスクシネートであってもよい。

【０４６３】

「ステルス脂質」は、ナノ粒子がｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば、血液中）で存在できる時間の長さを変化させる脂質である。ステルス脂質は、例えば、粒子凝集を低減させかつ粒子サイズを制御することにより、配合物処理を補助し得る。本明細書において使用されるステルス脂質は、ＬＮＰの薬物動態特性をモジュレートしてもよい。本開示の脂質組成物において使用するために好適なステルス脂質としては、脂質部分に連結された親水性頭部基を有するステルス脂質が挙げられるがこれに限定されない。本開示の脂質組成物において使用するため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に見出すことができる。追加の好適なＰＥＧ脂質は、例えば、ＷＯ２００６／００７７１２に開示されている。

【０４６４】

一実施形態では、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んでもよい。一部の実施形態では、ステルス脂質はＰＥＧ脂質である。

【０４６５】

一実施形態では、ステルス脂質は、ＰＥＧ（ポリ（エチレンオキシド）と称されることもある）、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］に基づくポリマーから選択されるポリマー部分を含む。

【０４６６】

一実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ（ポリ（エチレンオキシド）と称されることもある）に基づくポリマー部分を含む。

【０４６７】

ＰＥＧ脂質は脂質部分をさらに含む。一部の実施形態では、脂質部分は、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もよく、ジアシルグリセロールまたはジアシルグリカミドとしては、約Ｃ４～約Ｃ４０の飽和または不飽和の炭素原子を独立して含むアルキル鎖長を有する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を含むものが挙げられ、鎖は、１つまたは複数の官能基、例えば、アミドまたはエステルなどを含んでもよい。一部の実施形態では、アルキル鎖長（ａｌｋｙｌ　ｃｈａｉｌ　ｌｅｎｇｔｈ）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つまたは複数の置換アルキル基をさらに含むことができる。鎖長は、対称的または非対称的であってもよい。

【０４６８】

そうでないことを指し示さなければ、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。一実施形態では、ＰＥＧは、エチレングリコールまたはエチレンオキシドの任意選択的に置換されている直鎖状または分岐鎖状ポリマーである。一実施形態では、ＰＥＧは非置換である。一実施形態では、ＰＥＧは、例えば、１つまたは複数のアルキル、アルコキシ、アシル、ヒドロキシ、またはアリール基により置換されている。一実施形態では、該用語は、ＰＥＧコポリマー、例えば、ＰＥＧ－ポリウレタンまたはＰＥＧ－ポリプロピレン（例えば、Ｊ．Ｍｉｌｔｏｎ　Ｈａｒｒｉｓ，Ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ）ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｃａｌ　ａｎｄ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（１９９２）を参照）を含み、別の実施形態では、該用語はＰＥＧコポリマーを含まない。一実施形態では、ＰＥＧは、約１３０～約５０，０００、副次的実施形態では約１５０～約３０，０００、副次的実施形態では約１５０～約２０，０００、副次的実施形態では約１５０～約１５，０００、副次的実施形態では約１５０～約１０，０００、副次的実施形態では約１５０～約６，０００、副次的実施形態では約１５０～約５，０００、副次的実施形態では約１５０～約４，０００、副次的実施形態では約１５０～約３，０００、副次的実施形態では約３００～約３，０００、副次的実施形態では約１，０００～約３，０００、副次的実施形態では約１，５００～約２，５００の分子量を有する。

【０４６９】

ある特定の実施形態では、ＰＥＧ（例えば、脂質部分または脂質、例えばステルス脂質に共役されている）は、「ＰＥＧ　２０００」とも称される「ＰＥＧ－２Ｋ」であり、ＰＥＧ－２Ｋは約２，０００ダルトンの平均分子量を有する。ＰＥＧ－２Ｋは以下の式（Ｉ）により本明細書において表され、ｎは４５、すなわち、数平均重合度は約４５個のサブユニットを含む。しかしながら、当該技術分野において公知の他のＰＥＧの実施形態が使用されてもよく、該実施形態としては、例えば、数平均重合度が約２３個のサブユニット（ｎ＝２３）、および／または６８個のサブユニット（ｎ＝６８）を含むものが挙げられる。一部の実施形態では、ｎは約３０～約６０の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｎは約３５～約５５の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｎは約４０～約５０の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｎは約４２～約４８の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｎは４５であってもよい。一部の実施形態では、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てもよい。一部の実施形態では、Ｒは非置換アルキルであってもよい。一部の実施形態では、Ｒはメチルであってもよい。

【０４７０】

本明細書に記載される任意の実施形態では、ＰＥＧ脂質は、ＰＥＧ－ジラウロイルグリセロール、ＰＥＧ－ジミリストイルグリセロール（ＰＥＧ－ＤＭＧ）（カタログ＃　ＧＭ－０２０；ＮＯＦ、Ｔｏｋｙｏ、Ｊａｐａｎ）、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＃　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’－（コレスタ－５－エン－３

［ベータ］－オキシ）カルボキサミド－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－ジテトラデコキシベンジル（ｄｉｔｅｔｒａｄｅｃｏｘｙｌｂｅｎｚｙｌ）－［オメガ］－メチル－ポリ（エチレングリコール）エーテル）、１，２－ジミリストイル－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－ＤＭＧ）（ｃａｔ．　＃８８０１５０Ｐ；Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ、Ａｌａｂａｓｔｅｒ、Ａｌａｂａｍａ、ＵＳＡ）、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）（ｃａｔ．　＃８８０１２０Ｃ；Ａｖａｎｔｉ　Ｐｏｌａｒ　Ｌｉｐｉｄｓ、Ａｌａｂａｓｔｅｒ、Ａｌａｂａｍａ、ＵＳＡ）、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）から選択されてもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧであってもよい。一部の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＳＧであってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＳＰＥであってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＡであってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－Ｃ－ＤＭＡであってもよい。一実施形態では、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。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＳＡであってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１であってもよい。一部の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１４であってもよい。一部の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１６であってもよい。一部の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－Ｃ１８であってもよい。

【０４７１】

ＬＮＰ配合物

【０４７２】

ＬＮＰは、（ｉ）封入およびエンドソームエスケープのためのアミン脂質、（ｉｉ）安定化のための中性脂質、（ｉｉｉ）これもまた安定化のためのヘルパー脂質、ならびに（ｉｖ）ステルス脂質、例えばＰＥＧ脂質を含有してもよい。

【０４７３】

一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡ、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ、およびｇＲＮＡの１つまたは複数を含むＲＮＡ成分を含んでもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼおよびＲＮＡ成分としてｇＲＮＡを含んでもよい。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、ＲＮＡ成分、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびステルス脂質を含んでもよい。ある特定のＬＮＰ組成物では、ヘルパー脂質はコレステロールである。他の組成物では、中性脂質はＤＳＰＣである。追加の実施形態では、ステルス脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧまたはＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、リピドＡまたはリピドＡの均等物、ヘルパー脂質、中性脂質、ステルス脂質、およびガイドＲＮＡを含む。ある特定の組成物では、アミン脂質はリピドＡである。ある特定の組成物では、アミン脂質はリピドＡまたはそのアセタールアナログであり、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、かつ、ステルス脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。

【０４７４】

ある特定の実施形態では、脂質組成物は、配合物中の成分脂質の各々のモル比にしたがって記載される。本開示の実施形態は、配合物中の成分脂質の各々のモル比にしたがって記載される脂質組成物を提供する。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約３０モル％～約６０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約４０モル％～

約６０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約４５モル％～約６０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約５０モル％～約６０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約５５モル％～約６０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約５０モル％～約５５モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約５０モル％であってもよい。一実施形態では、アミン脂質のモル％は約５５モル％であってもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰバッチのアミン脂質モル％は、標的モル％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、または±２．５％である。一部の実施形態では、ＬＮＰバッチのアミン脂質モル％は、標的モル％の±４モル％、±３モル％、±２モル％、±１．５モル％、±１モル％、±０．５モル％、または±０．２５モル％である。全てのモル％の数は、ＬＮＰ組成物の脂質成分の比率として与えられる。ある特定の実施形態では、アミン脂質モル％のＬＮＰロット間のばらつきは、１５％未満、１０％未満または５％未満である。

【０４７５】

一実施形態では、中性脂質のモル％は約５モル％～約１５モル％であってもよい。一実施形態では、中性脂質のモル％は約７モル％～約１２モル％であってもよい。一実施形態では、中性脂質のモル％は約９モル％であってもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰバッチの中性脂質モル％は、標的中性脂質モル％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、または±２．５％である。ある特定の実施形態では、ＬＮＰロット間のばらつきは、１５％未満、１０％未満または５％未満である。

【０４７６】

一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約２０モル％～約６０モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約２５モル％～約５５モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約２５モル％～約５０モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約２５モル％～約４０モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約３０モル％～約５０モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は約３０モル％～約４０モル％であってもよい。一実施形態では、ヘルパー脂質のモル％は、脂質成分が１００モル％となるようにアミン脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質濃度に基づいて調整される。一部の実施形態では、ＬＮＰバッチのヘルパーモル％は、標的モル％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、または±２．５％である。ある特定の実施形態では、ＬＮＰロット間のばらつきは、１５％未満、１０％未満または５％未満である。

【０４７７】

一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約１モル％～約１０モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約２モル％～約１０モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約２モル％～約８モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約２モル％～約４モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約２．５モル％～約４モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約３モル％であってもよい。一実施形態では、ＰＥＧ脂質のモル％は約２．５モル％であってもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰバッチのＰＥＧ脂質モル％は、標的ＰＥＧ脂質モル％の±３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、または±２．５％である。ある特定の実施形態では、ＬＮＰロット間のばらつきは、１５％未満、１０％未満または５％未満である。

【０４７８】

ある特定の実施形態では、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、またはＣａｓ９）をコードするｍＲＮＡ、およびｇＲＮＡまたはｇＲＮＡをコードする核酸、またはｍＲＮＡとｇＲＮＡとの組合せを含む。一実施形態では、ＬＮＰ組成物はリピドＡまたはその均等物を含んでもよい。一部の態様では、アミン脂質はリピドＡである。一部の態様では、アミン脂質はリピドＡ均等物、例えば、リピドＡのアナログである。ある特定の態様では、アミン脂質はリピドＡの

アセタールアナログである。様々な実施形態では、ＬＮＰ組成物は、アミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびＰＥＧ脂質を含む。ある特定の実施形態では、ヘルパー脂質はコレステロールである。ある特定の実施形態では、中性脂質はＤＳＰＣである。特定の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、リピドＡ、ヘルパー脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質を含んでもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、アミン脂質、ＤＳＰＣ、コレステロール、およびＰＥＧ脂質を含む。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、ＤＭＧを含むＰＥＧ脂質を含む。ある特定の実施形態では、アミン脂質は、リピドＡ、およびリピドＡのアセタールアナログなどのリピドＡの均等物から選択される。追加の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、リピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含む。

【０４７９】

本開示の実施形態はまた、アミン脂質の正に荷電したアミン基（Ｎ）と封入される核酸の負に荷電したリン酸基（Ｐ）との間のモル比にしたがって記載される脂質組成物を提供する。これは、式Ｎ／Ｐにより数学的に表すことができる。一部の実施形態では、ＬＮＰ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；および核酸成分を含んでもよく、Ｎ／Ｐ比は約３～１０である。一部の実施形態では、ＬＮＰ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；およびＲＮＡ成分を含んでもよく、Ｎ／Ｐ比は約３～１０である。一実施形態では、Ｎ／Ｐ比は約５～７であってもよい。一実施形態では、Ｎ／Ｐ比は約４．５～８であってもよい。一実施形態では、Ｎ／Ｐ比は約６であってもよい。一実施形態では、Ｎ／Ｐ比は６±１であってもよい。一実施形態では、Ｎ／Ｐ比は約６±０．５であってもよい。一部の実施形態では、Ｎ／Ｐ比は、標的Ｎ／Ｐ比の３０％、±２５％、±２０％、±１５％、±１０％、±５％、または±２．５％である。ある特定の実施形態では、ＬＮＰロット間のばらつきは、１５％未満、１０％未満または５％未満である。

【０４８０】

一部の実施形態では、ＲＮＡ成分は、本明細書において開示されるｍＲＮＡなどのｍＲＮＡ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含んでもよい。一実施形態では、ＲＮＡ成分はＣａｓ９　ｍＲＮＡを含んでもよい。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む一部の組成物では、ＬＮＰは、ｇＲＮＡなどのｇＲＮＡ核酸をさらに含む。一部の実施形態では、ＲＮＡ成分はＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含む。一部の実施形態では、ＲＮＡ成分はクラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含む。

【０４８１】

ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、本明細書において開示されるｍＲＮＡ、例えば、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質を含んでもよい。クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含むある特定のＬＮＰ組成物では、ヘルパー脂質はコレステロールである。クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む他の組成物では、中性脂質はＤＳＰＣである。クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む追加の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧまたはＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含む特定の組成物では、アミン脂質は、リピドＡおよびその均等物、例えば、リピドＡのアセタールアナログから選択される。

【０４８２】

一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物はｇＲＮＡを含んでもよい。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、アミン脂質、ｇＲＮＡ、ヘルパー脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質を含んでもよい。ｇＲＮＡを含むある特定のＬＮＰ組成物では、ヘルパー脂質はコレステロールである。ｇＲＮＡを含む一部の組成物では、中性脂質はＤＳＰＣである。ｇＲＮＡを含む追加の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧまたはＰＥＧ２ｋ－Ｃ１

１である。ある特定の実施形態では、アミン脂質は、リピドＡおよびその均等物、例えば、リピドＡのアセタールアナログから選択される。

【０４８３】

一実施形態では、ＬＮＰ組成物はｓｇＲＮＡを含んでもよい。一実施形態では、ＬＮＰ組成物はＣａｓ９　ｓｇＲＮＡを含んでもよい。一実施形態では、ＬＮＰ組成物はＣｐｆ１　ｓｇＲＮＡを含んでもよい。ｓｇＲＮＡを含む一部の組成物では、ＬＮＰは、アミン脂質、ヘルパー脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質を含む。ｓｇＲＮＡを含むある特定の組成物では、ヘルパー脂質はコレステロールである。ｓｇＲＮＡを含む他の組成物では、中性脂質はＤＳＰＣである。ｓｇＲＮＡを含む追加の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧまたはＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。ある特定の実施形態では、アミン脂質は、リピドＡおよびその均等物、例えば、リピドＡのアセタールアナログから選択される。

【０４８４】

ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含み、ｇＲＮＡはｓｇＲＮＡであってもよい。一実施形態では、ＬＮＰ組成物は、アミン脂質、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡ、ｇＲＮＡ、ヘルパー脂質、中性脂質、およびＰＥＧ脂質を含んでもよい。ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡおよびｇＲＮＡを含むある特定の組成物では、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を含む一部の組成物では、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を含む追加の実施形態では、ＰＥＧ脂質はＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧまたはＰＥＧ２ｋ－Ｃ１１である。ある特定の実施形態では、アミン脂質は、リピドＡおよびその均等物、例えば、リピドＡのアセタールアナログから選択される。

【０４８５】

ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、クラス２　Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡおよび少なくとも１つのｇＲＮＡを含む。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約２５：１～約１：２５の、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡに対するｇＲＮＡの比を含む。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ配合物は、約１０：１～約１：１０の、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡに対するｇＲＮＡの比を含む。ある特定の実施形態では、ＬＮＰ配合物は、約８：１～約１：８の、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡに対するｇＲＮＡの比を含む。本明細書において測定される場合、比は重量による。一部の実施形態では、ＬＮＰ配合物は、約５：１～約１：５の、クラス２　Ｃａｓ　ｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡに対するｇＲＮＡの比を含む。一部の実施形態では、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。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ対ｍＲＮＡ比は約３：１または約２：１である。一部の実施形態では、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼなどのＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡに対するｇＲＮＡ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であってもよい。

【０４８６】

本明細書において開示されるＬＮＰ組成物は鋳型核酸を含んでもよい。鋳型核酸は、クラス２　ＣａｓヌクレアーゼｍＲＮＡなどのＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと共に配合されてもよい。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ガイドＲＮＡと共に配合されてもよい。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡの両方と共に配合されてもよい。一部の実施形態では、鋳型核酸は、ＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡまたはガイドＲＮＡとは別々に配合されてもよい。鋳型核酸は、ＬＮＰ組成物と共に、またはＬＮＰ組成物とは別々に送達されてもよい。一部の実施形態では、鋳型核酸は、所望の修復機構に応じて、一本鎖または二本鎖であってもよい。鋳型は、標的ＤＮＡ、または標的ＤＮＡに隣接する配列に対して相同性の領

域を有してもよい。

【０４８７】

一部の実施形態では、ＬＮＰは、水性ＲＮＡ溶液を有機溶媒系脂質溶液、例えば、１００％のエタノールと混合することにより形成される。好適な溶液または溶媒としては、水、ＰＢＳ、トリス緩衝液、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、イソプロパノールが挙げられ、またはこれらを含有してもよい。例えば、ＬＮＰのｉｎ　ｖｉｖｏ投与のために、薬学的に許容される緩衝液を使用してもよい。ある特定の実施形態では、緩衝液を使用して、ＬＮＰを含む組成物のｐＨはｐＨ６．５またはそれより高くに維持される。ある特定の実施形態では、緩衝液を使用して、ＬＮＰを含む組成物のｐＨはｐＨ７．０またはそれより高くに維持される。ある特定の実施形態では、組成物は、約７．２～約７．７の範囲内のｐＨを有する。追加の実施形態では、組成物は、約７．３～約７．７の範囲内または約７．４～約７．６の範囲内のｐＨを有する。さらなる実施形態では、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プローブを用いて測定されてもよい。ある特定の実施形態では、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、最大１０％の凍結保護剤、例えば、スクロースなどを含んでもよい。ある特定の実施形態では、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。ある特定の実施形態では、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。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は緩衝液を含んでもよい。一部の実施形態では、緩衝液は、リン酸緩衝液（ＰＢＳ）、トリス緩衝液、クエン酸緩衝液、およびこれらの混合物を含んでもよい。ある特定の例示的な実施形態では、緩衝液はＮａＣｌを含む。ある特定の実施形態（ｅｍｂｏｉｄｍｅｎｔｓ）では、ＮａＣｌは省略される。ＮａＣｌの例示的な量は約２０ｍＭ～約４５ｍＭの範囲内であってもよい。ＮａＣｌの例示的な量は約４０ｍＭ～約５０ｍＭの範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ＮａＣｌの量は約４５ｍＭである。一部の実施形態では、緩衝液はトリス緩衝液である。トリスの例示的な量は約２０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲内であってもよい。トリスの例示的な量は約４０ｍＭ～約６０ｍＭの範囲内であってもよい。一部の実施形態では、トリスの量は約５０ｍＭである。一部の実施形態では、緩衝液はＮａＣｌおよびトリスを含む。ＬＮＰ組成物のある特定の例示的な実施形態は、トリス緩衝液中の５％のスクロースおよび４５ｍＭのＮａＣｌを含有する。他の例示的な実施形態では、組成物は、約５％ｗ／ｖの量のスクロース、約４５ｍＭのＮａＣｌ、および約５０ｍＭのトリスをｐＨ７．５で含有する。塩、緩衝液、および凍結保護剤の量は、全体的な配合物の重量オスモル濃度が維持されるように変更されてもよい。例えば、最終重量オスモル濃度は、４５０ｍＯｓｍ／Ｌ未満に維持されてもよい。さらなる実施形態では、重量オスモル濃度は３５０～２５０ｍＯｓｍ／Ｌである。ある特定の実施形態は、３００＋／－２０ｍＯｓｍ／Ｌの最終重量オスモル濃度を有する。

【０４８８】

一部の実施形態では、マイクロ流体混合、Ｔ混合、または交差混合が使用される。ある特定の態様では、流速、ジャンクションサイズ、ジャンクション幾何学形状、ジャンクション形状、管直径、溶液、ならびに／またはＲＮＡおよび脂質濃度は変更されてもよい。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、濃縮または精製されてもよい。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貯蔵されてもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は２～８℃において貯蔵され、ある特定の態様では、ＬＮＰ組成物は室温で貯蔵される。追加の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、例えば－２０℃または－８０℃において凍結されて貯蔵される。他の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約０℃～約－８０℃の範囲内の温度において貯蔵される。凍結されたＬＮＰ組成物は、例えば、氷上、４℃、室温、または２５℃で、使用前に解凍されてもよい。凍結されたＬＮＰ組成物は、様々な温度、例

えば、氷上、４℃、室温、２５℃、または３７℃で維持されてもよい。

【０４８９】

一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約８０％より高い封入を有する。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約１２０ｎｍ未満の粒子サイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約０．２未満のｐｄｉを有する。一部の実施形態では、これらの特徴の少なくとも２つが存在する。一部の実施形態では、これらの３つの特徴のそれぞれが存在する。これらのパラメーターを決定する分析方法は、一般の試薬および方法のセクションにおいて以下に議論される。

【０４９０】

一部の実施形態では、マイクロ流体混合、Ｔ混合、または交差混合が使用される。ある特定の態様では、流速、ジャンクションサイズ、ジャンクション幾何学形状、ジャンクション形状、管直径、溶液、ならびに／またはＲＮＡおよび脂質濃度は変更されてもよい。ＬＮＰまたはＬＮＰ組成物は、例えば、透析またはクロマトグラフィーを介して、濃縮または精製されてもよい。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貯蔵されてもよい。一部の実施形態では、ＬＮＰ組成物は２～８℃において貯蔵され、ある特定の態様では、ＬＮＰ組成物は室温で貯蔵される。追加の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、例えば－２０℃または－８０℃において凍結されて貯蔵される。他の実施形態では、ＬＮＰ組成物は、約０℃～約－８０℃の範囲内の温度において貯蔵される。凍結されたＬＮＰ組成物は、例えば、氷上、室温、または２５℃で、使用前に解凍されてもよい。

【０４９１】

本開示のＬＮＰの多分散性指数（「ｐｄｉ」）およびサイズを特徴付けるために動的光散乱（「ＤＬＳ」）を使用することができる。ＤＬＳは、試料を光供給源に供することの結果としてもたらされる光の散乱を測定する。ＤＬＳ測定から決定されるＰＤＩは、集団中の粒子サイズの分布（平均粒子サイズの周囲）を表し、完全に均一な集団は０のＰＤＩを有する。一部の実施形態では、ｐｄｉは０．００５～０．７５の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｐｄｉは０．０１～０．５の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｐｄｉは０．０２～０．４の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｐｄｉは０．０３～０．３５の範囲内であってもよい。一部の実施形態では、ｐｄｉは０．１～０．３５の範囲内であってもよい。

【０４９２】

一部の実施形態では、本明細書において開示されるＬＮＰは１～２５０ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは１０～２００ｎｍのサイズを有する。さらなる実施形態では、ＬＮＰは２０～１５０ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは５０～１５０ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは５０～１００ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは５０～１２０ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは７５～１５０ｎｍのサイズを有する。一部の実施形態では、ＬＮＰは３０～２００ｎｍのサイズを有する。そうでないことを指し示さなければ、本明細書において言及される全てのサイズは、Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒでの動的光散乱により測定される、完全に形成されたナノ粒子の平均サイズ（直径）である。ナノ粒子試料はリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中に希釈され、カウント速度は約２００～４００ｋｃｔｓである。データは、強度測定値の加重平均として提示される。一部の実施形態では、ＬＮＰは、５０％～１００％の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、ＬＮＰは、５０％～７０％の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、ＬＮＰは、７０％～９０％の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、ＬＮＰは、９０％～１００％の範囲内の平均封入効率で形成される。一部の実施形態では、ＬＮＰは、７５％～９５％の範囲内の平均封入効率で形成される。

【０４９３】

一部の実施形態では、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合した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。一部の実施形態で

は、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合したＬＮＰは、ＡＴＴＲを有する対象においてアミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積および凝集を低減させまた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。一部の実施形態では、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合したＬＮＰは、血清ＴＴＲ濃度を低減させ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。一部の実施形態では、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合したＬＮＰは、対象、例えば哺乳動物、例えばヒトなどの霊長動物におけるＡＴＴＲの治療において使用するためのものである。一部の実施形態では、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合した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動物におけるアミロイドまたはアミロイド原線維中のＴＴＲの蓄積および凝集の低減または予防において使用するためのものである。一部の実施形態では、本明細書において開示されるｇＲＮＡと会合したＬＮＰは、対象、例えば哺乳動物、例えばヒトなどの霊長動物における血清ＴＴＲ濃度の低減において使用するためのものである。

【０４９４】

エレクトロポレーションもまた、カーゴの送達のための周知の手段であり、任意のエレクトロポレーション方法論が、本明細書において開示されるｇＲＮＡのいずれか１つの送達のために使用されてもよい。一部の実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書において開示されるｇＲＮＡのいずれか１つおよび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ｍＲＮＡを送達するために使用されてもよい。

【０４９５】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書において開示されるｇＲＮＡのいずれか１つをｅｘ　ｖｉｖｏの細胞に送達する方法であって、ｇＲＮＡがＬＮＰと会合しているか、またはＬＮＰと会合していない、方法を含む。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰまたはｇＲＮＡはまた、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ｍＲＮＡと会合している。

【０４９６】

ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるガイド配列のいずれか１つまたは複数を含むガイドＲＮＡのいずれかをコードするＤＮＡまたはＲＮＡベクターを含む。一部の実施形態では、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、プロモーター、エンハンサー、調節配列、およびＣａｓ９などのヌクレアーゼであり得るＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードする核酸が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、ベクターは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡをコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ベクターは、ｓｇＲＮＡをコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列およびＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼは、Ｃａｓ９またはＣｐｆ１などのＣａｓヌクレアーゼであり得る。一部の実施形態では、ベクターは、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡをコードする１つまたは複数のヌクレオチド配列およびＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを含み、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼは、Ｃａｓ９などのＣａｓタンパク質であり得る。一実施形態では、Ｃａｓ９は、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）からのもの（すなわち、ＳｐｙＣａｓ９）である。一部の実施形態では、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システムからの反復配列の全体または部分により隣接されたガイド配列を含むまたはからなる。ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを含むまたはからなる核酸は、ｃｒＲＮＡ、ｔｒＲＮＡ、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡと共に天然に見出されない核酸を含むまたはからなるベクター配列をさらに含んでもよい。

【０４９７】

一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、１つのベクター内の不連続の核酸によりコードされる。他の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、連続する核酸によりコードされてもよい。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一の核酸の反対の鎖によりコードされる。他の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一の核酸の同じ鎖によりコードされる。

【０４９８】

一部の実施形態では、ベクターは環状であってもよい。他の実施形態では、ベクターは直鎖状であってもよい。一部の実施形態では、ベクターは、脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスキャプシド中に閉じ込められていてもよい。非限定的な例示的なベクターとしては、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、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が挙げられる。

【０４９９】

一部の実施形態では、ベクターはウイルスベクターであってもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、その野生型対応物から遺伝子改変されていてもよい。例えば、ウイルスベクターは、１つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失、または置換を含んでもよく、それにより、クローニングが促進されるか、またはベクターの１つもしくは複数の特性が変化していてもよい。そのような特性としては、パッケージング能力、形質導入効率、免疫原性、ゲノム組込み、複製、転写、および翻訳が挙げられる。一部の実施形態では、ウイルスゲノムの部分は、ウイルスがより大きいサイズを有する外因性配列をパッケージングすることができるように欠失されてもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、増進させた形質導入効率を有してもよい。一部の実施形態では、宿主中でウイルスにより誘導される免疫応答は低減されてもよい。一部の実施形態では、宿主ゲノムへのウイルス配列の組込みを促進するウイルス遺伝子（例えば、インテグラーゼなど）は、ウイルスが非組込み型となるように突然変異されてもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは複製欠陥性であってもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ベクター上のコーディング配列の発現を推進するための外因性の転写または翻訳制御配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ウイルスはヘルパー依存性であってもよい。例えば、ウイルスは、ベクターを増幅するためおよびウイルス粒子にパッケージングするために必要とされるウイルス成分（例えば、ウイルスタンパク質など）を供給するために１つまたは複数のヘルパーウイルスを必要としてもよい。そのような場合、ウイルス成分をコードする１つまたは複数のベクターなどの１つまたは複数のヘルパー成分は、本明細書に記載されるベクターシステムと共に宿主細胞に導入されてもよい。他の実施形態では、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、いかなるヘルパーウイルスなしでベクターを増幅およびパッケージングできるものであってもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載されるベクターシステムはまた、ウイルス増幅およびパッケージングのために必要とされるウイルス成分をコードしてもよい。

【０５００】

非限定的な例示的なウイルスベクターとしては、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）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（ＨＤＡｄ）、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ－１）ベクター、バクテリオファージＴ４、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が挙げられる。一部の実施形態では、ウイルスベクターはＡＡＶベクターであってもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ３Ｂ、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ６．２、ＡＡＶ７、ＡＡＶｒｈ．６４Ｒ１、ＡＡＶｈｕ．３７、ＡＡＶｒｈ．８、ＡＡＶｒｈ．３２．３３、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶｒｈ１０、またはＡＡＶＬＫ０３である。他の実施形態では、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。

【０５０１】

一部の実施形態では、レンチウイルスは非組込み型であってもよい。一部の実施形態では、ウイルスベクターはアデノウイルスベクターであってもよい。一部の実施形態では、アデノウイルスは、高クローニング能力または「ガットレス」アデノウイルスであっても

よく、該アデノウイルスでは、５’および３’逆末端反復（ＩＴＲ）ならびにパッケージングシグナル（「Ｉ」）以外の全てのコーディングウイルス領域がウイルスから欠失されて、パッケージング能力が増加している。さらに他の実施形態では、ウイルスベクターはＨＳＶ－１ベクターであってもよい。一部の実施形態では、ＨＳＶ－１ベースのベクターはヘルパー依存性であり、他の実施形態では、ヘルパー非依存性である。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の構造成分を有するヘルパーウイルスを必要とするが、非必須ウイルス機能を除去する３０ｋｂ欠失ＨＳＶ－１ベクターはヘルパーウイルスを必要としない。追加の実施形態では、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。一部の実施形態では、バクテリオファージＴ４は、ウイルスの頭部が空である時に任意の直鎖状または環状のＤＮＡまたはＲＮＡ分子をパッケージングできるものであってもよい。さらなる実施形態では、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。いっそうさらなる実施形態では、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では、本明細書において開示されるようなベクターシステムの全ての成分を送達するために１つより多くのベクターを使用することが必要なことがある。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もよく、第２のＡＡＶベクターは１つまたは複数のガイド配列を含有してもよい。

【０５０２】

一部の実施形態では、ベクターは、細胞中での１つまたは複数のコーディング配列の発現を推進できるものであってもよい。一部の実施形態では、細胞は、原核細胞、例えば、細菌細胞などであってもよい。一部の実施形態では、細胞は、真核細胞、例えば、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物細胞などであってもよい。一部の実施形態では、真核細胞は哺乳動物細胞であってもよい。一部の実施形態では、真核細胞は齧歯動物細胞であってもよい。一部の実施形態では、真核細胞はヒト細胞であってもよい。異なる種類の細胞中での発現を推進するために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。一部の実施形態では、プロモーターは野生型であってもよい。他の実施形態では、プロモーターは、より効率的または有効な発現のために改変されていてもよい。さらに他の実施形態では、プロモーターは、切断されているがそれでもなおその機能を保持するものであってもよい。例えば、プロモーターは、通常のサイズ、また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好適な低減されたサイズを有してもよい。

【０５０３】

一部の実施形態では、ベクターは、本明細書に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んでもよい。一部の実施形態では、ベクターにより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。一部の実施形態では、ベクターシステムは、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の１つのコピーを含んでもよい。他の実施形態では、ベクターシステムは、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の１つより多くのコピーを含んでもよい。一部の実施形態では、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制御配列に作動可能に連結されていてもよい。一部の実施形態では、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つのプロモーターに作動可能に連結されていてもよい。

【０５０４】

一部の実施形態では、プロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的なものであってもよい。一部の実施形態では、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としては、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－アルファ（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、これらの機能的断片、または以上のいずれかの組合せが挙げられる。一部の実施形態では、プロモーターはＣＭＶプロモーターであってもよい。一部の実施形態では、プロモーターは、切断されたＣＭＶプロモーターであってもよい。他の実施形態では、プロモーターはＥＦ１ａプロモーターであってもよい。一部の実施形態では、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としては、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り誘導可能なものが挙げられる。一部の実施形態では、誘導性プロモーターは、低い基礎（非誘導）発現レベルを有するもの、例えば、Ｔｅｔ－Ｏｎ（登録商標）プロモーター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などであってもよい。

【０５０５】

一部の実施形態では、プロモーターは、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓における発現に特異的なプロモーターであってもよい。

【０５０６】

ベクターは、本明細書に記載されるガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、ベクターは、ガイドＲＮＡの１つのコピーを含む。他の実施形態では、ベクターは、ガイドＲＮＡの１つより多くのコピーを含む。１つより多くのガイドＲＮＡを有する実施形態では、ガイドＲＮＡは、異なる標的配列を標的化するように非同一であってもよく、または、同じ標的配列を標的化するように同一であってもよい。ベクターが１つより多くのガイドＲＮＡを含む一部の実施形態では、各ガイドＲＮＡは、他の異なる特性、例えば、Ｃａｓ　ＲＮＰ複合体などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼとの複合体内での活性または安定性を有してもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも１つの転写または翻訳制御配列、例えば、プロモーター、３’ＵＴＲ、または５’ＵＴＲに作動可能に連結されていてもよい。一実施形態では、プロモーターは、ｔＲＮＡプロモーター、例えば、ｔＲＮＡ$^{Lys3}$、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。一部の実施形態では、プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩＩ）により認識されてもよい。Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターの非限定的な例としては、Ｕ６およびＨ１プロモーターが挙げられる。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトＵ６プロモーターに作動可能に連結されていてもよい。他の実施形態では、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Ｈ１プロモーターに作動可能に連結されていてもよい。１つより多くのガイドＲＮＡを有する実施形態では、発現を推進するために使用されるプロモーターは、同じまたは異なるものであってもよい。一部の実施形態では、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、同じベクター上に提供されてもよい。一部の実施形態では、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、同じプロモーターにより推進されてもよい。一部の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一の転写物に転写されてもよい。例えば、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一の転写物からプロセシングされて、二重分子ガイドＲＮＡを形成してもよい。あるいは、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、単一分子ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に転写されてもよい。他の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、同じベクター上のそれらに対応するプロモーターにより推進されてもよい。さらに他の実施形態では、ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、異なるベクターによりコードされてもよい。

【０５０７】

一部の実施形態では、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じベクター上に位置してもよい。一部の実施形態では、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

より推進されてもよい。一部の実施形態では、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推進する同じプロモーターにより推進されてもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡおよびＣａｓタンパク質などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ転写物は、単一の転写物内に含有されてもよい。例えば、ガイドＲＮＡは、Ｃａｓタンパク質などのＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ転写物の非翻訳領域（ＵＴＲ）内にあってもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、転写物の５’ＵＴＲ内にあってもよい。他の実施形態では、ガイドＲＮＡは、転写物の３’ＵＴＲ内にあってもよい。一部の実施形態では、転写物の細胞内半減期は、その３’ＵＴＲ内にガイドＲＮＡを含有し、それによりその３’ＵＴＲの長さを短縮することにより低減されてもよい。追加の実施形態では、ガイドＲＮＡは、転写物のイントロン内にあってもよい。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡが転写物から適切にスプライシングされるように、好適なスプライス部位が、ガイドＲＮＡが位置するイントロンにおいて付加されてもよい。一部の実施形態では、時間的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てもよい。

【０５０８】

一部の実施形態では、組成物はベクターシステムを含む。一部の実施形態では、ベクターシステムは１つの単一のベクターを含んでもよい。他の実施形態では、ベクターシステムは２つのベクターを含んでもよい。追加の実施形態では、ベクターシステムは３つのベクターを含んでもよい。異なるガイドＲＮＡが多重化のために使用される場合、またはガイドＲＮＡの複数のコピーが使用される場合、ベクターシステムは３つより多くのベクターを含んでもよい。

【０５０９】

一部の実施形態では、ベクターシステムは、標的細胞に送達された後に初めて発現を開始させるための誘導性プロモーターを含んでもよい。非限定的な例示的な誘導性プロモーターとしては、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り誘導可能なものが挙げられる。一部の実施形態では、誘導性プロモーターは、低い基礎（非誘導）発現レベルを有するもの、例えば、Ｔｅｔ－Ｏｎ（登録商標）プロモーター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）などであってもよい。

【０５１０】

追加の実施形態では、ベクターシステムは、特定の組織に送達された後に初めて発現を開始させるための組織特異的プロモーターを含んでもよい。

【０５１１】

ベクターは、リポソーム、ナノ粒子、エキソソーム、または微小胞により送達されてもよい。ベクターはまた、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）により送達されてもよい。例えば、２０１６年１２月１２日に出願された「ＬＩＰＩＤ　ＮＡＮＯＰＡＲＴＩＣＬＥ　ＦＯＲＭＵＬＡＴＩＯＮＳ　ＦＯＲ　ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ　ＣＯＭＰＯＮＥＮＴＳ」という名称のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．６２／４３３，２２８（その内容は参照することにより全体が本明細書に組み込まれる）を参照。本明細書に記載される任意のＬＮＰおよびＬＮＰ配合物は、単独でのまたはＣａｓヌクレアーゼもしくはＣａｓヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡと一緒でのガイドの送達のために好適である。一部の実施形態では、ＲＮＡ成分および脂質成分を含むＬＮＰ組成物が包含され、脂質成分は、アミン脂質、中性脂質、ヘルパー脂質、およびステルス脂質を含み、かつ、Ｎ／Ｐ比は約１～１０である。

【０５１２】

一部の事例では、脂質成分は、リピドＡまたはそのアセタールアナログ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ－ＤＭＧを含み、かつ、Ｎ／Ｐ比は約１～１０である。一部の実施形態では、脂質成分は、約４０～６０モル％のアミン脂質、約５～１５モル％の中性脂質、および約１．５～１０モル％のＰＥＧ脂質を含み、脂質成分の残りの部分はヘルパー脂質であり、かつ、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～１０である。一部の実施形態では、脂質成分は、約５０～６０モル％のアミン脂質、約８～１０モル％の中性脂質、およ

び約２．５～４モル％のＰＥＧ脂質を含み、脂質成分の残りの部分はヘルパー脂質であり、かつ、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～８である。一部の事例では、脂質成分は、約５０～６０モル％のアミン脂質、約５～１５モル％のＤＳＰＣ、および約２．５～４モル％のＰＥＧ脂質を含み、脂質成分の残りの部分はコレステロールであり、かつ、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は約３～８である。一部の事例では、脂質成分は、４８～５３モル％のリピドＡ、約８～１０モル％のＤＳＰＣ、および１．５～１０モル％のＰＥＧ脂質を含み、脂質成分の残りの部分はコレステロールであり、かつ、ＬＮＰ組成物のＮ／Ｐ比は３～８±０．２である。

【０５１３】

一部の実施形態では、ベクターは、全身に送達されてもよい。一部の実施形態では、ベクターは、肝臓循環に送達されてもよい。

【０５１４】

この説明および例示的な実施形態は、限定的なもの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の目的のために、そうでないことを指し示さなければ、本明細書および特許請求の範囲において使用される量、パーセンテージ、または割合を表現する全ての数、および他の数値は、既にそのように修飾されていなければ、全ての事例において「約」という用語により修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、そうでないことを指し示さなければ、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値的パラメーターは、得ようとする所望の特性に応じて変更されてもよいおおよそのものである。少なくとも、そして特許請求の範囲への均等論の適用を制限しようとするものではなく、各数値的パラメーターは、少なくとも、報告される有効数字の数に照らしておよび通常の丸めの技術を適用することにより解釈されるべきである。

【０５１５】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」、ならびに任意の語の任意の単数形の使用は、１つの指示対象に明示的かつ明確に限定されなければ、複数の指示対象を含むことが留意される。本明細書において使用される場合、「含む」という用語およびその文法的変形は非限定的であることが意図され、リスト中の項目の列挙は、列挙された項目を置換しまたは該項目に加えられ得る他の同様の項目を排除しない。

【実施例】

【０５１６】

以下の実施例は、ある特定の開示される実施形態を実例と共に説明するために提供され、いかなる意味でも本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【０５１７】

実施例１．材料および方法

ヌクレアーゼｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写（「ＩＶＴ」）

線状化プラスミドＤＮＡ鋳型およびＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写により、Ｎ１－メチルシュードＵを含有するキャップ付加およびポリアデニル化ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）（「Ｓｐｙ」）Ｃａｓ９ｍＲＮＡを生成した。Ｔ７プロモーター、配列番号：１または２による転写用の配列、および１００ｎｔのポリ（Ａ／Ｔ）領域を含有するプラスミドＤＮＡを、以下の条件：２００ｎｇ／μＬのプラスミド、２Ｕ／μＬのＸｂａＩ（ＮＥＢ）、および１ｘの反応緩衝液を用いてＸｂａＩと３７℃で２時間インキュベートすることにより線状化した。６５℃で２０分間反応液を加熱することによりＸｂａＩを不活性化した。シリカマキシスピンカラム（Ｅｐｏｃｈ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して酵素および緩衝塩から線状化プラスミドを精製し、アガロースゲルにより分析して線状化を確認した。Ｃａｓ９改変ｍＲＮＡを生成するためのＩＶＴ反応液を、以下の条件：５０ｎｇ／μＬの線状化プラスミド；各２ｍＭのＧＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、およびＮ１－メチルシュードＵＴＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；１０ｍＭのＡＲＣＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；５Ｕ／μＬのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）；１Ｕ／μＬのマウスリボヌクレアーゼ阻害剤（ＮＥＢ）；０．００４Ｕ

／μＬの無機Ｅ．ｃｏｌｉピロホスファターゼ（ＮＥＢ）；および１ｘの反応緩衝液において３７℃で４時間インキュベートした。４時間のインキュベーション後、ＴＵＲＢＯＤＮａｓｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を０．０１Ｕ／μＬの最終濃度まで加え、反応液をさらに３０分間インキュベートしてＤＮＡ鋳型を除去した。製造業者のプロトコール（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）にしたがってＭｅｇａＣｌｅａｒ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ｃｌｅａｎ－ｕｐ ｋｉｔを使用してＣａｓ９ ｍＲＮＡを酵素およびヌクレオチドから精製した。あるいは、ｍＲＮＡを沈殿プロトコールを通じて精製し、一部の場合には、その後にＨＰＬＣベースの精製を行った。簡潔に述べれば、デオキシリボヌクレアーゼ消化後、０．２１ｘ体積の７．５ＭのＬｉＣｌ溶液を加えて混合することによりｍＲＮＡを沈殿させ、沈殿したｍＲＮＡを遠心分離によりペレット化した。上清を除去した後、ｍＲＮＡを水中に再構成した。酢酸アンモニウムおよびエタノールを使用してｍＲＮＡを再び沈殿させた。５Ｍの酢酸アンモニウムを２Ｍの最終濃度まで２ｘ体積の１００％ＥｔＯＨと共にｍＲＮＡ溶液に加えた。溶液を混合し、－２０℃で１５分間インキュベートした。沈殿したｍＲＮＡを遠心分離により再びペレット化した後、上清を除去し、ｍＲＮＡを水中に再構成した。最終ステップとして、酢酸ナトリウムおよびエタノールを使用してｍＲＮＡを沈殿させた。１／１０の体積の３Ｍ酢酸ナトリウム（ｐＨ５．５）を２ｘ体積の１００％ ＥｔＯＨと共に溶液に加えた。溶液を混合し、－２０℃で１５分間インキュベートした。沈殿したｍＲＮＡを遠心分離により再びペレット化し、上清を除去し、ペレットを７０％の冷エタノールで洗浄し、空気乾燥させた。ｍＲＮＡを水中に再構成した。ＨＰＬＣ精製ｍＲＮＡについて、ＬｉＣｌ沈殿および再構成の後に、ｍＲＮＡをＲＰ－ＩＰ ＨＰＬＣにより精製した（例えば、Ｋａｒｉｋｏ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１１，Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．２１ ｅ１４２を参照）。プールのために選択した画分を合わせ、上記のように酢酸ナトリウム／エタノール沈殿により脱塩させた。２６０ｎｍでの吸光度を測定（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）することにより転写物濃度を決定し、Ｂｉｏａｎｌａｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によるキャピラリー電気泳動により転写物を分析した。

【０５１８】

ＲＮＡに関して以下において配列番号：１および２を参照する場合、ＴはＵ（上記のようにＮ１－メチルシュードウリジン）で置き換えるべきであることが理解される。実施例において使用したＣａｓ９ ｍＲＮＡは、例えば最大１００ｎｔの、５’キャップおよび３’ポリＡテイルを含み、配列番号により特定される。

【０５１９】

配列番号：１：転写用のＣａｓ９配列１

ＧＧＧＴＣＣＣＧＣＡＧＴＣＧＧＣＧＴＣＣＡＧＣＧＧＣＴＣＴＧＣＴＴＧＴＴＣＧＴＧ
ＴＧＴＧＴＧＴＣＧＴＴＧＣＡＧＧＣＣＴＴＡＴＴＣＧＧＡＴＣＣＧＣＣＡＣＣＡＴＧＧ
ＡＣＡＡＧＡＡＧＴＡＣＡＧＣＡＴＣＧＧＡＣＴＧＧＡＣＡＴＣＧＧＡＡＣＡＡＡＣＡＧ
ＣＧＴＣＧＧＡＴＧＧＧＣＡＧＴＣＡＴＣＡＣＡＧＡＣＧＡＡＴＡＣＡＡＧＧＴＣＣＣＧ
ＡＧＣＡＡＧＡＡＧＴＴＣＡＡＧＧＴＣＣＴＧＧＧＡＡＡＣＡＣＡＧＡＣＡＧＡＣＡＣＡ
ＧＣＡＴＣＡＡＧＡＡＧＡＡＣＣＴＧＡＴＣＧＧＡＧＣＡＣＴＧＣＴＧＴＴＣＧＡＣＡＧ
ＣＧＧＡＧＡＡＡＣＡＧＣＡＧＡＡＧＣＡＡＣＡＡＧＡＣＴＧＡＡＧＡＧＡＡＣＡＧＣＡ
ＡＧＡＡＧＡＡＧＡＴＡＣＡＣＡＡＧＡＡＧＡＡＡＧＡＡＣＡＧＡＡＴＣＴＧＣＴＡＣＣ
ＴＧＣＡＧＧＡＡＡＴＣＴＴＣＡＧＣＡＡＣＧＡＡＡＴＧＧＣＡＡＡＧＧＴＣＧＡＣＧＡ
ＣＡＧＣＴＴＣＴＴＣＣＡＣＡＧＡＣＴＧＧＡＡＧＡＡＡＧＣＴＴＣＣＴＧＧＴＣＧＡＡ
ＧＡＡＧＡＣＡＡＧＡＡＧＣＡＣＧＡＡＡＧＡＣＡＣＣＣＧＡＴＣＴＴＣＧＧＡＡＡＣＡ
ＴＣＧＴＣＧＡＣＧＡＡＧＴＣＧＣＡＴＡＣＣＡＣＧＡＡＡＡＧＴＡＣＣＣＧＡＣＡＡＴ
ＣＴＡＣＣＡＣＣＴＧＡＧＡＡＡＧＡＡＧＣＴＧＧＴＣＧＡＣＡＧＣＡＣＡＧＡＣＡＡＧ
ＧＣＡＧＡＣＣＴＧＡＧＡＣＴＧＡＴＣＴＡＣＣＴＧＧＣＡＣＴＧＧＣＡＣＡＣＡＴＧＡ
ＴＣＡＡＧＴＴＣＡＧＡＧＧＡＣＡＣＴＴＣＣＴＧＡＴＣＧＡＡＧＧＡＧＡＣＣＴＧＡＡ
ＣＣＣＧＧＡＣＡＡＣＡＧＣＧＡＣＧＴＣＧＡＣＡＡＧＣＴＧＴＴＣＡＴＣＣＡＧＣＴＧ
ＧＴＣＣＡＧＡＣＡＴＡＣＡＡＣＣＡＧＣＴＧＴＴＣＧＡＡＧＡＡＡＡＣＣＣＧＡＴＣＡ

ACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAG
ACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG
CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGA
TCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAA
CTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG
GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGA
TCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAA
CCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTC
AACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGA
TCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCT
GAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAG
GAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGAT
ACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTT
CATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA
CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGC
AGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCA
CCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGAC
TTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAA
AGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCT
GGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAG
AGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCG
TCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAAT
GACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTG
CCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACA
ACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAG
AAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGGCAATC
GTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCA
AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTT
CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAAC
GCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCA
AGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACAT
CCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGAC
AGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACC
TGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAA
ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAAC
GGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACT
TCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCA
GCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATC
CAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACG
AACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA
GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTC
AAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCG
AAATGGCAAGAGAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA
GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATC
AAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG
AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTA
CCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG
GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCG
TCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAA
GGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC

AACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACT
ACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAG
AAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTG
AGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGG
TCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCT
GGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAG
CTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGC
TGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGT
CAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATAC
CTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACC
CGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT
CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAA
ATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACA
TCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGG
AGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAA
ACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAA
CAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGT
CAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAA
AGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAA
GAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGA
CAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAG
GTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGG
AACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGA
AAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAG
GAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACA
GCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGC
AAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTG
CCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACT
ACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAA
GCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAA
ATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC
TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAA
CAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAAC
ATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGG
CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG
ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATC
CACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACC
TGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAA
GAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATC
TCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCA
ATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAG
CCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATT
TTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAA
AGAACCTCGAG

【０５２０】

配列番号：２：転写用のＣａｓ９配列２

GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTG
TGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGATAAGA
AGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGG
TTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAG

AAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCA
AGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGA
AACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGA
CGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAG
AGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTT
CTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGAC
AAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCG
ACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCA
TCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGAC
CTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAAT 10
TCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGA
TAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGTGCAG
ACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTA
GCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTC
GAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCG
GGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTC
TCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGA
CCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACC
TACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCG
ATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTC 20
GGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACC
GAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGC
GGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGC
GCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATC
TTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCG
ATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAA
GCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTG
GTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAA
CCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGG
TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTAC 30
CCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTC
TGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCG
CGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAG
GAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTGGATA
AGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAATGACCAA
CTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAG
CACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAC
TGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCC
GGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTCGAT
CTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGC 40
TTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTC
AGTGGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCG
CTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACA
AGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGA
AGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAG
ATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCG
ACGATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACAC
TGGTTGGGGCCGCCTCTCCGCAAGCTGATCAACGGTATT
CGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCA
AATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGAT 50

CCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAA
GCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACA
TCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAAT
TCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTC
ATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGG
CCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTC
CCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAAATCAAGGAG
CTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACA
CGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAA
AAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATC
AATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCAC
AGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAACAAGGTGTT
GACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTG
CCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGC
GGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTT
TGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAG
CTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGA
CTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTC
CCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATC
CGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGT
CGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGA
AATCAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAAC
GCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAAC
TTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGA
CGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGG
AAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGA
ACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAAT
CAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGC
GAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTC
GCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAA
AACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATC
CTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGA
AAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCC
GACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAG
AAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGC
TGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAA
CCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTG
AAGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGT
TCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGC
CGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGC
AAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAA
AACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCT
TTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATC
GAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCG
ACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCA
TAGAGATAAGCCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATC
CACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCT
TCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACAC
GTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCCGACCCTGATCCACCAA
AGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGC

ＡＧＣＴＧＧＧＴＧＧＣＧＡＴＧＧＣＧＧＴＧＧＡＴＣＴＣＣＧＡＡＡＡＡＧＡＡＧＡＧ
ＡＡＡＧＧＴＧＴＡＡＴＧＡＧＣＴＡＧＣＣＡＴＣＡＣＡＴＴＴＡＡＡＡＧＣＡＴＣＴＣ
ＡＧＣＣＴＡＣＣＡＴＧＡＧＡＡＴＡＡＧＡＧＡＡＡＧＡＡＡＡＡＴＧＡＡＧＡＴＣＡＡＴ
ＡＧＣＴＴＡＴＴＣＡＴＣＴＣＴＴＴＴＴＣＴＴＴＴＴＣＧＴＴＧＧＴＧＴＡＡＡＧＣＣ
ＡＡＣＡＣＣＣＴＧＴＣＴＡＡＡＡＡＡＣＡＴＡＡＡＴＴＴＣＴＴＴＡＡＴＣＡＴＴＴＴ
ＧＣＣＴＣＴＴＴＴＣＴＣＴＧＴＧＣＴＴＣＡＡＴＴＡＡＴＡＡＡＡＡＡＡＴＧＧＡＡＡＧ
ＡＡＣＣＴＣＧＡＧ

【０５２１】

カニクイザル相同性ガイドの設計と共にヒトＴＴＲガイドの設計およびヒトＴＴＲ

ヒト参照ゲノム（例えば、ｈｇ３８）およびユーザー定義の目的のゲノム領域（例えば、ＴＴＲタンパク質コーディングエクソン）を使用して、目的の領域中のＰＡＭを同定するために、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏで初期ガイド選択を行った。各同定されたＰＡＭについて解析を行い、統計を報告する。多数の基準（例えば、ＧＣ含量、予測されるオンターゲット活性、および潜在的なオフターゲット活性）に基づいてｇＲＮＡ分子をさらに選択および順位付けした。

ＴＴＲ（ＥＮＳＧ００００００１１８２７１）に対して計６８のガイドＲＮＡをエクソン１、２、３および４内のタンパク質コーディング領域を標的化して設計した。計６８のガイドのうち、３３個はカニクイザル（「カニクイザル」（ｃｙｎｏ））において１００％相同であった。加えて、カニクイザルにおいて完全には相同でない１０個のヒトＴＴＲガイドについて、対応するカニクイザル標的配列に完全にマッチするように「サロゲート」ガイドを並行して設計および作製した。これらの「サロゲート」または「ツール」ガイドをカニクイザルにおいてスクリーニングして、例えば、相同ヒトガイド配列の活性および機能を近似することができる。ガイド配列および対応するゲノム座標を提供する（表１）。全てのガイドＲＮＡはデュアルガイドＲＮＡとして作製し、ガイド配列のサブセットは修飾シングルガイドＲＮＡとして作製した（表２）。デュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）ＩＤ、修飾シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）ＩＤ、カニクイザルゲノムに対するミスマッチ数の他に、カニクイザルの正確にマッチするＩＤにわたるガイドＩＤアライメントを提供する（表３）。実施例の全体を通じて詳述される実験においてｄｇＲＮＡが使用される場合、配列番号：２７０を使用した。

【０５２２】

Ｃａｓ９ ｍＲＮＡおよびｉｎ ｖｉｔｒｏでのガイドＲＮＡの送達

ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞株。Ｓｐｙ Ｃａｓ９を構成的に発現するヒト胎児腎臓腺癌細胞株ＨＥＫ２９３（「ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９」）を、１０％のウシ胎児血清および５００μｇ／ｍｌのＧ４１８を添加したＤＭＥＭ培地中で培養した。細胞をトランスフェクションの２４時間前に９６ウェルプレートに１０，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングした。製造業者のプロトコールにしたがって細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．１３７７８１５０）をトランスフェクトした。細胞に個々のｃｒＲＮＡ（２５ｎＭ）、ｔｒＲＮＡ（２５ｎＭ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（０．３μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するリポプレックスをトランスフェクトした。

【０５２３】

ＨＵＨ７細胞株。ヒト肝細胞癌細胞株ＨＵＨ７（Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ Ｃｅｌｌ Ｂａｎｋ、Ｃａｔ．ＪＣＲＢ０４０３）を１０％のウシ胎児血清を添加したＤＭＥＭ培地中で培養した。細胞をトランスフェクションの２０時間前に９６ウェルプレートに１５，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングした。製造業者のプロトコールにしたがって細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．ＬＭＲＮＡ００３）をトランスフェクトした。細胞にＳｐｙ Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ（１００ｎｇ）、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（０．３μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するリポプレックス、その後に個々のｃｒＲＮＡ（２５ｎＭ）、トレーサーＲＮＡ（２

５ｎＭ）、ＭｅｓｓｅｎｇｅｒＭＡＸ（０．３μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有する別々のリポプレックスを逐次的にトランスフェクトした。

【０５２４】

ＨｅｐＧ２細胞株。ヒト肝細胞癌細胞株ＨｅｐＧ２（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、Ｃａｔ．ＨＢ－８０６５）を１０％のウシ胎児血清を添加したＤＭＥＭ培地中で培養した。細胞を計数し、トランスフェクションの２４時間前に９６ウェルプレートに１０，０００細胞／ウェルの密度でＢｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩをコーティングした９６ウェルプレート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．８７７２７２）にプレーティングした。製造業者のプロトコールにしたがって細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．１１６６８０１９）をトランスフェクトした。細胞にＳｐｙ Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ（１００ｎｇ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（０．２μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するリポプレックス、その後に個々のｃｒＲＮＡ（２５ｎＭ）、トレーサーＲＮＡ（２５ｎＭ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００（０．２μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有する別々のリポプレックスを逐次的にトランスフェクトした。

【０５２５】

初代肝臓肝細胞。初代ヒト肝臓肝細胞（ＰＨＨ）および初代カニクイザル肝臓肝細胞（ＰＣＨ）（Ｇｉｂｃｏ）を製造業者のプロトコール（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、プロトコール１１．２８．２０１２）にしたがって培養した。簡潔に述べれば、細胞を解凍し、添加物を有する肝細胞解凍培地（Ｇｉｂｃｏ、Ｃａｔ．ＣＭ７０００）中に再懸濁した後、ヒトについて１００ｇで１０分間、カニクイザルについて８０ｇで４分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化された細胞を肝細胞プレーティング培地＋添加物パック（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ．Ａ１２１７６０１およびＣＭ３０００）に再懸濁した。細胞を計数し、ヒトについて３３，０００細胞／ウェルまたはカニクイザルについて６０，０００細胞／ウェル（または、以下にさらに記載する、ＴＴＲタンパク質に対する効果をアッセイする場合には６５，０００細胞／ウェル）の密度でＢｉｏ－ｃｏａｔコラーゲンＩをコーティングした９６ウェルプレート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．８７７２７２）にプレーティングした。プレーティングされた細胞を組織培養インキュベーター中、３７℃および５％の$CO_2$雰囲気で６または２４時間静置して接着させた。インキュベーション後に細胞を単層形成について確認し、培地を無血清添加物パックを含む肝細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｔ．Ａ１２１７６０１およびＣＭ４０００）で置き換えた。

【０５２６】

Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭａｘ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．１３７７８１５０）ベースのトランスフェクションを製造業者のプロトコールの通りに実行した。細胞にＳｐｙ Ｃａｓ９ ｍＲＮＡ（１００ｎｇ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭａｘ（０．４μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するリポプレックス、その後にｃｒＲＮＡ（２５ｎＭ）およびトレーサーＲＮＡ（２５ｎＭ）またはｓｇＲＮＡ（２５ｎＭ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭａｘ（０．４μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有する別々のリポプレックスを逐次的にトランスフェクトした。

【０５２７】

リボヌクレオチドを形成させた後、ガイドＲＮＡを搭載したＳｐｙ Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）を細胞にエレクトロポレーションまたはトランスフェクションした。デュアルガイド（ｄｇＲＮＡ）について、個々のｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを、同等の量の試薬を混合し、９５℃で２分間インキュベートし、室温に冷却することにより予備アニーリングさせた。シングルガイド（ｓｇＲＮＡ）を９５℃で２分間煮沸し、室温に冷却した。煮沸したｄｇＲＮＡまたはｓｇＲＮＡをＯｐｔｉｍｅｍ中、室温で１０分間Ｓｐｙ Ｃａｓ９タンパク質とインキュベートして、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を形成させた。

【０５２８】
初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞へのＲＮＰのエレクトロポレーションのために、細胞を解凍し、Ｌｏｎｚａ ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒａｔｉｏｎ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｃｅｌｌ Ｐ３緩衝液中にヒト肝細胞について２５００細胞／μＬ、カニクイザル肝細胞について３５００細胞／μＬの濃度で再懸濁する。ガイド当たり２０μＬの体積の再懸濁した細胞および５μＬのＲＮＰを混合する。２０μＬの混合物をＬｏｎｚａエレクトロポレーションプレートに入れる。予め設定したプロトコールＥＸ－１４７を用いてＬｏｎｚａ ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒを使用して細胞へのエレクトロポレートを行った。エレクトロポレーション後、予備加熱した維持培地を含有するＢｉｏｃｏａｔプレートに細胞を移し、３７℃および５％の$CO_2$の組織培養インキュベーターに入れる。

【０５２９】
ＲＮＰリポプレックスのトランスフェクションのために、製造業者のプロトコールにしたがって細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ． １３７７８１５０）をトランスフェクトした。細胞にＳｐｙ Ｃａｓ９（１０ｎＭ）、個々のガイド（１０ｎＭ）、トレーサーＲＮＡ（１０ｎＭ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（１．０μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するＲＮＰをトランスフェクトした。ＲＮＰの形成は上記のように行った。

【０５３０】
製造業者のプロトコールにしたがってＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標） Ｂｅｎｃｈｔｏｐ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔを使用して脂質およびＲＮＡ溶液のマイクロ流体混合を行うことにより、またはクロスフロー混合により、ＬＮＰを形成させた。

【０５３１】
ＬＮＰ配合物－ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ
一般に、脂質ナノ粒子成分を様々なモル比の脂質成分で１００％のエタノール中に溶解させた。ＲＮＡカーゴを２５ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５．０）に溶解させて、約０．４５ｍｇ／ｍＬのＲＮＡカーゴの濃度を結果として得た。約４．５または約６の脂質アミン対ＲＮＡホスフェート（Ｎ：Ｐ）のモル比、１：１のｍＲＮＡ対ｇＲＮＡの重量比でＬＮＰを配合した。

【０５３２】
製造業者のプロトコールにしたがってＰｒｅｃｉｓｉｏｎ Ｎａｎｏｓｙｓｔｅｍｓ ＮａｎｏＡｓｓｅｍｂｌｒ（商標） Ｂｅｎｃｈｔｏｐ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔを使用して脂質およびＲＮＡ溶液のマイクロ流体混合を行うことによりＬＮＰを形成させた。流速の差異を使用して混合の間の水性溶媒対有機溶媒の２：１の比を維持した。混合後、ＬＮＰを回収し、水中に希釈し（約１：１ｖ／ｖ）、１時間室温で保持し、水でさらに希釈した後（約１：１ｖ／ｖ）、最終緩衝液交換を行った。５０ｍＭのトリス、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）への最終緩衝液交換は、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を用いて完了した。必要な場合、Ａｍｉｃｏｎ １００ｋＤａ遠心フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて遠心分離により配合物を濃縮した。結果として得られた混合物を次に、０．２μｍの無菌フィルターを使用して濾過した。最終のＬＮＰをさらなる使用まで－８０℃で貯蔵した。

【０５３３】
ＬＮＰ配合物－クロスフロー
クロスフロー技術を使用して調製されるＬＮＰについて、２体積のＲＮＡ溶液および１体積の水とのエタノール中の脂質の衝突ジェット混合によりＬＮＰを形成させた。エタノール中の脂質を混合クロスを通じて２体積のＲＮＡ溶液と混合する。水の第４のストリームをインラインティーを通じてクロスの出口ストリームと混合する（ＷＯ２０１６０１０８４０の図２を参照）。ＬＮＰを室温で１時間保持し、水でさらに希釈した（約１：１ｖ／ｖ）。希釈したＬＮＰをフラットシートカートリッジ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、１００ｋＤ ＭＷＣＯ）でのタンジェンシャルフロー濾過を使用して濃縮した後、緩衝液をダイア

フィルトレーションにより５０ｍＭのトリス、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）に交換した。あるいは、ＴＳＳへの最終緩衝液交換は、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を用いて完了した。必要な場合、Ａｍｉｃｏｎ　１００ｋＤａ遠心フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を用いて遠心分離により配合物を濃縮した。結果として得られた混合物を次に、０．２μｍの無菌フィルターを使用して濾過した。最終のＬＮＰをさらなる使用まで４℃または－８０℃で貯蔵した。

【０５３４】

配合物の分析

本開示のＬＮＰの多分散性指数（「ｐｄｉ」）およびサイズを特徴付けるために動的光散乱（「ＤＬＳ」）が使用される。ＤＬＳは、試料を光供給源に供することの結果としてもたらされる光の散乱を測定する。ＤＬＳ測定から決定されるＰＤＩは、集団中の粒子サイズの分布（平均粒子サイズの周囲）を表し、完全に均一な集団は０のＰＤＩを有する。Ｍａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ　ＤＬＳ機器を使用して動的光散乱（ＤＬＳ）により平均粒子サイズおよび多分散性を測定する。ＤＬＳによる測定の前にＬＮＰ試料をＰＢＳ中で３０Ｘに希釈した。平均粒子サイズの強度ベースの測定値であるＺ平均直径を数平均直径およびｐｄｉと共に報告した。ＬＮＰのゼータ電位を測定するためにもＭａｌｖｅｒｎ　Ｚｅｔａｓｉｚｅｒ機器を使用する。測定の前に試料を０．１ＸのＰＢＳ、ｐＨ７．４で１：１７（５０ｕＬを８００ｕＬに）希釈する。

【０５３５】

蛍光ベースのアッセイ（Ｒｉｂｏｇｒｅｅｎ（登録商標）、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してトータルＲＮＡ濃度および遊離ＲＮＡを決定する。封入効率は、（トータルＲＮＡ－遊離ＲＮＡ）／トータルＲＮＡとして算出される。ＬＮＰ試料を０．２％のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００を含有する１ｘのＴＥ緩衝液で適切に希釈してトータルＲＮＡを決定し、または１ｘのＴＥ緩衝液で希釈して遊離ＲＮＡを決定する。配合物を作製するために使用され、１ｘのＴＥ緩衝液＋／－０．２％のＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００で希釈された出発ＲＮＡ溶液を利用することにより標準曲線を作製する。（製造業者の指示にしたがって）希釈したＲｉｂｏＧｒｅｅｎ（登録商標）染料を次に標準物質および試料のそれぞれに加え、光の非存在下、室温で約１０分インキュベートする。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｍ５　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用して試料を読み取り、励起、自動カットオフおよび発光波長はそれぞれ４８８ｎｍ、５１５ｎｍ、および５２５ｎｍに設定する。トータルＲＮＡおよび遊離ＲＮＡを適切な標準曲線から決定する。

【０５３６】

封入効率は、（トータルＲＮＡ－遊離ＲＮＡ）／トータルＲＮＡとして算出される。ＤＮＡベース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。一本鎖ＤＮＡのためにＯｌｉｇｒｅｅｎ　Ｄｙｅが使用されてもよく、二本鎖ＤＮＡのためにＰｉｃｏｇｒｅｅｎ　Ｄｙｅが使用されてもよい。

【０５３７】

典型的に、ＬＮＰを調製した場合、封入は＞８０％、粒子サイズは＜１２０ｎｍ、ｐｄｉは＜０．２であった。

【０５３８】

ｉｎ　ｖｉｖｏでのＬＮＰの送達

別段の記載がなければ、６～１０週齢のＣＤ－１雌マウスを各実験において使用した。動物を体重測定し、群平均体重に基づいて投与溶液を調製するために体重にしたがってグループ分けした。ＬＮＰを動物当たり０．２ｍＬの体積（体重１キログラム当たり約１０ｍＬ）で側尾静脈を介して投与した。動物を有害効果について投与の約６時間後に観察した。体重を投与の２４時間後に測定し、動物をイソフルラン（ｉｓｏｆｌｏｕｒａｎｅ）麻酔下の心臓穿刺を介する失血により様々な時点において安楽死させた。血液を血清分離チューブまたは本明細書に記載されるように血漿のための緩衝化クエン酸ナトリウムを含有するチューブに回収した。ｉｎ　ｖｉｖｏ編集を伴う実験のために、肝臓組織をＤＮＡ

抽出および分析のために各動物の中葉または３つの独立した葉（例えば、右中葉、左中葉、および外側左葉）から回収した。

【０５３９】

動物実験において使用したトランスサイレチン（ＴＴＲ）ＥＬＩＳＡ分析

指し示すように血液を回収し、血清を単離した。全マウスＴＴＲ血清レベルをＭｏｕｓｅ　Ｐｒｅａｌｂｕｍｉｎ（Ｔｒａｎｓｔｈｙｒｅｔｉｎ）　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｃａｔ．　ＯＫＩＡ００１１１）を使用して決定し、ラットＴＴＲ血清レベルをラット特異的ＥＬＩＳＡキット（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、カタログ番号ＯＫＩＡ００１５９）を使用して測定し、ヒトＴＴＲ血清レベルをヒト特異的ＥＬＩＳＡキット（Ａｖｉｖａ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、カタログ番号ＯＫＩＡ０００８１）を使用して測定し、それぞれは、製造業者のプロトコールにしたがって行った。簡潔に述べれば、血清をキットの試料希釈剤を用いて１０，０００倍、またはマウス血清中でヒトＴＴＲを測定する場合は５，０００倍の最終希釈まで段階希釈した。１００ｕｌの調製した標準曲線または希釈した血清試料をＥＬＩＳＡプレートに加え、室温で３０分間インキュベートした後、提供される洗浄緩衝液を用いて３回洗浄した。次に１００ｕＬの検出抗体を各ウェルに加え、室温で２０分間インキュベートした後、３回洗浄した。１００ｕＬの基質を加えた後、室温で１０分間インキュベートした後、１００ｕＬの停止溶液を加えた。内容物の吸光度をＳｐｅｃｔｒａｍａｘ　Ｍ５プレートリーダーで測定し、ＳｏｆｔｍａｘＰｒｏバージョン７．０ソフトウェアを使用して解析した。血清ＴＴＲレベルを４パラメーターロジスティックフィットを使用して標準曲線から定量化し、ｕｇ／ｍＬの血清またはノックダウン相対対照（ビヒクル処置）動物のパーセントとして表した。

【０５４０】

ゲノムＤＮＡの単離

トランスフェクトした細胞をトランスフェクションの２４、４８、または７２時間後に回収した。製造業者のプロトコールにしたがって５０μＬ／ウェルのＢｕｃｃａｌＡｍｐ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、Ｃａｔ．ＱＥ０９０５０）を使用して９６ウェルプレートの各ウェルからゲノムＤＮＡを抽出した。全てのＤＮＡ試料を本明細書に記載されるようにＰＣＲおよびその後のＮＧＳ解析に供した。

【０５４１】

次世代シークエンシング（「ＮＧＳ」）解析

ゲノム中の標的位置における編集の効率を定量的に決定するために、シークエンシングを利用して遺伝子編集により導入された挿入および欠失の存在を同定した。

【０５４２】

プライマーを目的の遺伝子（例えば、ＴＴＲ）内の標的部位の周囲に設計し、目的のゲノム区画を増幅した。

【０５４３】

追加のＰＣＲを製造業者のプロトコール（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）にしたがって行って、シークエンシング用の化学物質を加えた。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ機器でシークエンシングした。低いクオリティスコアを有するものを除去した後にリードを参照ゲノム（例えば、ヒト参照ゲノム（ｈｇ３８）、カニクイザル参照ゲノム（ｍｆ５）、ラット参照ゲノム（ｒｎ６）、またはマウス参照ゲノム（ｍｍ１０））に対してアライメントした。リードを含有する結果として得られたファイルを参照ゲノム（ＢＡＭファイル）に対してマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入、置換、または欠失を含有するリードの数に対する野生型リードの数を算出した。

【０５４４】

編集パーセンテージ（例えば、「編集効率」または「編集パーセント」または「インデル頻度」）は、野生型を含む、配列リードの総数にわたる挿入／欠失（「インデル」）または置換を有する配列リードの総数として定義される。

【０５４５】
ウエスタンブロットによる分泌されたトランスサイレチン（「ＴＴＲ」）タンパク質の分析
培地中のＴＴＲタンパク質の分泌レベルをウエスタンブロッティング法を使用して決定した。ＨｅｐＧ２細胞に表１からの選択ガイドを以前に記載された通りにトランスフェクトした。培地の変更はトランスフェクション後３日毎に行った。トランスフェクションの６日後に培地を除去し、細胞をウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有しない培地で１回洗浄した。血清を含まない培地を細胞に加え、３７℃でインキュベートした。４時間後に培地を除去し、遠心分離してあらゆるデブリをペレット化し、残留細胞に対するＣＴＧアッセイから得られた値およびプレート平均との比較に基づいて各ウェルについて細胞数を推定した。遠心分離後、培地を新たなプレートに移し、－２０℃で貯蔵した。培地のアセトン沈殿を行って、培地中に分泌されたあらゆるタンパク質を沈殿させた。４体積の氷冷したアセトンを１体積の培地に加えた。溶液を充分に混合し、－２０℃に９０分間保った。アセトン：培地混合物を１５，０００ｘｇおよび４℃で１５分間遠心分離した。上清を廃棄し、保持されたペレットを空気乾燥させてあらゆる残留アセトンを除去した。完全プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ．　１１６９７４９８００１）および１ｍＭのＤＴＴからなるプロテアーゼ阻害剤混合物を新たに加えた１５μＬのＲＩＰＡ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｃａｔ．　ＢＰ－１１５）にペレットを再懸濁した。溶解液をＬａｅｍｍｌｉ緩衝液と混合し、９５℃で１０分間変性させた。製造業者のプロトコールにしたがって１２％のビス－トリスゲル上でＮｕＰａｇｅシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用してウエスタンブロットを実行した後、０．４５μｍのニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｃａｔ．　１６２０１１５）へのウェット転写を行った。実験室用ロッカー（ｌａｂ　ｒｏｃｋｅｒ）上で室温で３０分間ＴＢＳ中の５％の粉乳を使用してブロットをブロッキングした。ブロットをＴＢＳＴですすぎ、ＴＢＳＴ中１：１０００でウサギα－ＴＴＲモノクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｔ．　Ａｂ７５８１５）を用いてプロービングを行った。アルファ－１アンチトリプシンをＴＢＳＴ中１：１０００でローディングコントロール（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ．　ＨＰＡ００１２９２）として使用し、ＴＴＲ一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットをバッグ中に密封し、実験室用ロッカー上で４℃で終夜保った。インキュベーション後、ブロットをＴＢＳＴ中で３回、各５分間すすぎ、室温で３０分間ＴＢＳＴ中１：２５，０００でウサギに対する二次抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．　ＰＩＳＡ５３５５７１）を用いてプロービングを行った。インキュベーション後、ブロットをＴＢＳＴ中で３回、各５分間、およびＰＢＳで２回すすいだ。ブロットを可視化し、Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙシステムを使用して解析した。

【０５４６】
ウエスタンブロットによる細胞内ＴＴＲの分析
肝細胞癌細胞株ＨＵＨ７に表１からの選択ガイドを以前に記載された通りにトランスフェクトした。トランスフェクションの６日後に培地を除去し、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ、Ｃａｔ．　１１６９７４９８００１）、１ｍＭのＤＴＴ、および２５０Ｕ／ｍｌのＢｅｎｚｏｎａｓｅ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｃａｔ．　７１２０６－３）からなるプロテアーゼ阻害剤混合物を新たに加えた５０μＬ／ウェルのＲＩＰＡ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｃａｔ．　ＢＰ－１１５）を用いて細胞を溶解した。細胞を氷上に３０分間保ち、その際にＮａＣｌ（１Ｍの最終濃度）を加えた。細胞溶解液を充分に混合し、氷上に３０分間保持した。全細胞抽出物（「ＷＣＥ」）をＰＣＲプレートに移し、遠心分離してデブリをペレット化させた。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｃａｔ．　５００－０００１）を使用して溶解液のタンパク質含有量を評価した。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイの手順は、製造業者のプロトコールにしたがって行った。使用前に抽出物を－２０℃で貯蔵した。ウエスタンブロットを行って細胞内ＴＴＲタンパク質レベルを評価した。溶解液をＬａｅｍｍｌｉ緩衝液と混合し、９５℃で１０分間変性させた。製造業者のプロトコールにしたがって１２％のビス－トリスゲ

ル上でＮｕＰａｇｅシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用してウエスタンブロットを実行した後、０．４５μｍのニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｃａｔ．　１６２０１１５）へのウェット転写を行った。転写膜を水で充分にすすぎ、Ｐｏｎｃｅａｕ Ｓ溶液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｃａｔ．　ＳＴ－１８０）で染色して完全かつ均一な転写を確認した。実験室用ロッカー上で室温で３０分間ＴＢＳ中の５％の粉乳を使用してブロットをブロッキングした。ブロットをＴＢＳＴですすぎ、ＴＢＳＴ中１：１０００でウサギα－ＴＴＲモノクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、Ｃａｔ．　Ａｂ７５８１５）を用いてプロービングを行った。β－アクチンをＴＢＳＴ中１：２５００でローディングコントロール（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．　ＡＭ４３０２）として使用し、ＴＴＲ一次抗体と同時にインキュベートした。ブロットをバッグ中に密封し、実験室用ロッカー上で４℃で終夜保った。インキュベーション後、ブロットをＴＢＳＴ中で３回、各５分間すすぎ、室温で３０分間ＴＢＳＴ中各１：２５，０００でマウスおよびウサギに対する二次抗体（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．　ＰＩ３５５１８およびＰＩＳＡ５３５５７１）を用いてプロービングを行った。インキュベーション後、ブロットをＴＢＳＴ中で３回、各５分間、およびＰＢＳで２回すすいだ。ブロットを可視化し、Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙシステムを使用して解析した。

【０５４７】

実施例２．ｄｇＲＮＡ配列のスクリーニング

複数の細胞種におけるＴＴＲ　ｄｇＲＮＡのクロススクリーニング

ヒトＴＴＲおよびカニクイザルのマッチした配列を標的化するｄｇＲＮＡ形式のガイドを、実施例１に記載されるようなＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９、ＨＵＨ７およびＨｅｐＧ２細胞株の他に、初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に送達した。各細胞種にわたり各ガイド配列を含むｃｒＲＮＡについて編集パーセントを決定し、次にガイド配列を最も高い編集％に基づいて順位付けした。５つ全ての細胞株における表１のガイド配列についてのスクリーニングデータを以下に列記する（表４～１１）。

【０５４８】

表４は、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質を構成的に過剰発現するヒト腎臓腺癌細胞株ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９におけるＴＴＲ　ｃｒＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表４－１】

表４：ｄｇＲＮＡをトランスフェクトされたＨｅｋ＿＿Ｃａｓ９細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003335 | 26.59 | 4.73 | 4.73 | 0.65 | 21.87 | 4.09 |
| CR003336 | 29.09 | 4.57 | 3.31 | 0.24 | 25.78 | 4.32 |
| CR003337 | 42.72 | 1.72 | 5.24 | 1.62 | 37.48 | 0.70 |
| CR003338 | 52.42 | 3.28 | 4.76 | 0.03 | 47.66 | 3.30 |
| CR003339 | 56.37 | 4.13 | 49.39 | 3.23 | 6.98 | 0.91 |
| CR003340 | 42.38 | 8.43 | 27.88 | 4.31 | 14.50 | 4.13 |
| CR003341 | 20.04 | 5.26 | 6.73 | 1.86 | 13.31 | 3.41 |
| CR003342 | 36.57 | 5.80 | 1.19 | 0.22 | 35.38 | 5.59 |
| CR003343 | 24.36 | 1.51 | 4.82 | 0.43 | 19.53 | 1.39 |
| CR003344 | 33.87 | 2.93 | 4.32 | 0.58 | 29.54 | 2.37 |
| CR003345 | 35.02 | 7.05 | 19.00 | 3.58 | 16.01 | 3.48 |
| CR003346 | 48.33 | 5.81 | 33.03 | 3.12 | 15.30 | 2.72 |
| CR003347 | 21.45 | 5.57 | 0.95 | 0.33 | 20.50 | 5.26 |
| CR003348 | 35.53 | 5.81 | 22.32 | 3.79 | 13.21 | 2.03 |
| CR003349 | 13.19 | 4.46 | 8.03 | 2.81 | 5.16 | 1.66 |
| CR003350 | 22.31 | 4.25 | 5.54 | 0.74 | 16.77 | 3.51 |
| CR003351 | 49.67 | 3.77 | 28.42 | 1.69 | 21.24 | 2.22 |
| CR003352 | 27.90 | 7.55 | 4.91 | 1.35 | 22.99 | 6.26 |
| CR003353 | 25.03 | 5.16 | 3.71 | 0.75 | 21.32 | 4.42 |
| CR003354 | 18.46 | 2.02 | 2.56 | 0.21 | 15.90 | 1.89 |
| CR003355 | 30.60 | 2.53 | 6.99 | 0.80 | 23.61 | 1.75 |
| CR003356 | 32.21 | 4.71 | 10.03 | 1.39 | 22.19 | 3.36 |
| CR003357 | 43.23 | 6.71 | 5.38 | 0.87 | 37.85 | 5.88 |
| CR003358 | 5.44 | 0.86 | 1.29 | 0.16 | 4.14 | 0.84 |
| CR003359 | 37.75 | 7.50 | 18.35 | 3.73 | 19.40 | 3.78 |
| CR003360 | 22.68 | 3.16 | 2.70 | 0.56 | 19.98 | 2.60 |
| CR003361 | 34.45 | 8.97 | 8.66 | 1.66 | 25.78 | 7.32 |
| CR003362 | 9.90 | 2.66 | 1.48 | 0.33 | 8.41 | 2.33 |
| CR003363 | 31.03 | 10.74 | 14.77 | 4.21 | 16.26 | 6.54 |
| CR003364 | 35.65 | 7.90 | 19.17 | 4.24 | 16.48 | 3.76 |
| CR003365 | 36.43 | 6.20 | 11.83 | 1.88 | 24.61 | 4.45 |
| CR003366 | 47.36 | 6.59 | 10.10 | 1.28 | 37.26 | 5.32 |
| CR003367 | 47.11 | 15.43 | 28.44 | 9.11 | 18.67 | 6.33 |
| CR003368 | 40.35 | 10.13 | 3.73 | 0.96 | 36.61 | 9.17 |
| CR003369 | 33.10 | 7.26 | 9.06 | 1.12 | 24.04 | 6.16 |
| CR003370 | 34.22 | 5.69 | 4.49 | 0.67 | 29.73 | 5.06 |
| CR003371 | 25.60 | 8.33 | 3.84 | 1.41 | 21.76 | 6.92 |
| CR003372 | 15.24 | 7.92 | 3.25 | 1.61 | 11.99 | 6.31 |

【表４－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003373 | 13.55 | 2.40 | 1.31 | 0.21 | 12.25 | 2.19 |
| CR003374 | 10.91 | 0.88 | 0.81 | 0.10 | 10.10 | 0.81 |
| CR003375 | 11.63 | 3.18 | 0.78 | 0.17 | 10.85 | 3.05 |
| CR003376 | 28.16 | 4.49 | 1.35 | 0.18 | 26.81 | 4.52 |
| CR003377 | 24.70 | 4.44 | 2.71 | 0.54 | 21.99 | 3.91 |
| CR003378 | 20.97 | 2.67 | 4.49 | 0.49 | 16.48 | 2.18 |
| CR003379 | 26.32 | 2.91 | 5.34 | 0.61 | 20.98 | 2.30 |
| CR003380 | 47.64 | 5.74 | 3.64 | 0.24 | 44.00 | 5.52 |
| CR003381 | 22.04 | 5.74 | 3.82 | 1.26 | 18.23 | 4.64 |
| CR003382 | 29.95 | 3.13 | 4.46 | 0.45 | 25.49 | 2.73 |
| CR003383 | 40.47 | 0.64 | 25.12 | 0.45 | 15.35 | 0.66 |
| CR003384 | 17.45 | 1.32 | 1.45 | 0.23 | 16.00 | 1.42 |
| CR003385 | 26.19 | 5.62 | 7.36 | 1.57 | 18.82 | 4.06 |
| CR003386 | 33.12 | 10.65 | 2.94 | 0.63 | 30.18 | 10.03 |
| CR003387 | 24.68 | 5.93 | 7.75 | 1.99 | 16.92 | 3.94 |
| CR003388 | 19.23 | 4.41 | 1.41 | 0.39 | 17.82 | 4.07 |
| CR003389 | 34.18 | 5.09 | 10.30 | 2.12 | 23.87 | 3.02 |
| CR003390 | 28.02 | 3.77 | 4.31 | 0.25 | 23.71 | 3.61 |
| CR003391 | 44.81 | 4.67 | 0.61 | 0.07 | 44.19 | 4.63 |
| CR003392 | 21.67 | 7.52 | 0.85 | 0.26 | 20.82 | 7.27 |

【０５４９】

表５は、ヒト肝細胞癌細胞株ＨＵＨ７におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）と共トランスフェクトされた試験したＴＴＲ　ｃｒＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表５－１】

表５：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｄｇＲＮＡをトランスフェクトされたＨＵＨ７細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003335 | 31.95 | 4.50 | 4.62 | 0.83 | 27.57 | 4.08 |
| CR003336 | 30.05 | 4.25 | 4.14 | 1.07 | 26.56 | 3.55 |
| CR003337 | 55.72 | 3.12 | 8.34 | 0.93 | 48.95 | 2.24 |
| CR003338 | 75.64 | 2.03 | 10.22 | 1.42 | 67.06 | 2.79 |
| CR003339 | 79.97 | 4.73 | 60.55 | 3.94 | 20.13 | 1.02 |
| CR003340 | 46.93 | 7.12 | 33.33 | 6.01 | 14.23 | 1.65 |
| CR003341 | 20.58 | 5.98 | 7.78 | 1.64 | 13.20 | 4.44 |
| CR003342 | 45.14 | 7.16 | 1.23 | 0.91 | 44.66 | 7.68 |
| CR003343 | 76.13 | 7.04 | 9.58 | 3.49 | 66.97 | 6.10 |
| CR003344 | 64.02 | 3.33 | 10.76 | 1.35 | 54.40 | 2.71 |
| CR003345 | 72.43 | 2.17 | 41.33 | 0.96 | 32.18 | 1.37 |
| CR003346 | 18.07 | 1.02 | 13.17 | 1.39 | 6.97 | 3.06 |
| CR003347 | 32.16 | 5.50 | 1.64 | 0.42 | 30.79 | 5.11 |
| CR003348 | 57.14 | 10.98 | 36.08 | 6.97 | 22.71 | 4.42 |
| CR003349 | 14.14 | 4.99 | 9.73 | 3.26 | 4.82 | 1.91 |
| CR003350 | 52.91 | 7.61 | 13.43 | 2.00 | 41.64 | 6.03 |
| CR003351 | 63.51 | 4.61 | 36.87 | 2.49 | 27.49 | 2.14 |
| CR003352 | 39.68 | 9.53 | 7.62 | 7.42 | 32.79 | 7.37 |
| CR003353 | 69.18 | 4.59 | 7.73 | 2.46 | 62.87 | 3.13 |
| CR003354 | 12.27 | 3.38 | 1.25 | 0.40 | 11.46 | 3.23 |
| CR003355 | 38.83 | 5.31 | 9.40 | 1.81 | 30.31 | 3.56 |
| CR003356 | 49.63 | 5.55 | 18.98 | 2.67 | 31.31 | 3.04 |
| CR003357 | 36.31 | 5.72 | 6.37 | 1.17 | 30.82 | 4.68 |
| CR003358 | 36.50 | 6.17 | 10.53 | 1.56 | 26.60 | 4.49 |
| CR003359 | 66.75 | 5.84 | 21.73 | 2.30 | 45.97 | 3.93 |
| CR003360 | 58.62 | 8.73 | 5.01 | 0.60 | 55.13 | 8.19 |
| CR003361 | 28.68 | 6.52 | 6.84 | 1.26 | 22.44 | 5.31 |
| CR003362 | 26.43 | 0.83 | 3.43 | 0.32 | 23.76 | 0.85 |
| CR003363 | 41.01 | 7.16 | 17.83 | 3.32 | 23.78 | 3.97 |
| CR003364 | 47.13 | 10.61 | 24.68 | 5.15 | 23.03 | 5.74 |
| CR003365 | 60.68 | 5.25 | 17.77 | 1.57 | 43.82 | 3.73 |
| CR003366 | 69.98 | 8.84 | 20.77 | 3.10 | 50.32 | 5.69 |
| CR003367 | 66.29 | 4.48 | 33.62 | 4.14 | 33.48 | 0.51 |
| CR003368 | 31.57 | 11.73 | 3.08 | 0.92 | 29.69 | 11.32 |
| CR003369 | 24.19 | 6.89 | 7.12 | 2.27 | 17.38 | 4.76 |
| CR003370 | 39.16 | 11.59 | 4.83 | 1.79 | 35.55 | 10.35 |
| CR003371 | 40.47 | 7.68 | 6.07 | 0.89 | 35.65 | 7.01 |
| CR003372 | 21.52 | 6.02 | 4.89 | 1.66 | 17.25 | 4.58 |
| CR003373 | 27.29 | 4.45 | 3.31 | 0.66 | 25.12 | 4.12 |

【表５－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003374 | 3.10 | 0.68 | 0.45 | 0.24 | 2.87 | 0.54 |
| CR003375 | 2.38 | 0.22 | 0.26 | 0.14 | 2.25 | 0.12 |
| CR003376 | 19.42 | 5.60 | 1.37 | 0.45 | 18.55 | 5.28 |
| CR003377 | 34.93 | 5.47 | 5.59 | 0.88 | 29.89 | 4.71 |
| CR003378 | 40.73 | 4.63 | 9.73 | 1.85 | 32.27 | 2.91 |
| CR003379 | 19.18 | 5.17 | 3.38 | 0.77 | 16.48 | 4.32 |
| CR003380 | 31.76 | 5.81 | 3.29 | 0.57 | 29.29 | 5.42 |
| CR003381 | 99.70 | 0.17 | 1.92 | 0.20 | 99.70 | 0.17 |
| CR003382 | 34.47 | 5.71 | 0.14 | 0.16 | 34.47 | 5.71 |
| CR003383 | 42.89 | 10.14 | 2.14 | 0.56 | 41.19 | 9.67 |
| CR003384 | 17.03 | 1.95 | 0.84 | 0.30 | 16.29 | 1.84 |
| CR003386 | 69.40 | 19.41 | 0.53 | 0.23 | 69.34 | 19.32 |
| CR003387 | 25.64 | 3.69 | 0.23 | 0.07 | 25.55 | 3.62 |
| CR003388 | 59.48 | 4.29 | 3.88 | 0.68 | 56.45 | 4.45 |
| CR003389 | 62.32 | 1.97 | 13.19 | 1.18 | 50.90 | 1.02 |
| CR003390 | 18.97 | 4.82 | 3.31 | 0.91 | 16.49 | 3.98 |
| CR003391 | 61.31 | 13.21 | 2.10 | 0.51 | 59.70 | 12.76 |
| CR003392 | 28.37 | 8.58 | 1.93 | 0.73 | 26.98 | 7.94 |

【０５５０】

表６は、ヒト肝細胞癌細胞株ＨｅｐＧ２におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）と共トランスフェクトされた試験したＴＴＲおよび対照ｃｒＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表６－１】

表６：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｄｇＲＮＡをトランスフェクトされたＨｅｐＧ２細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR001261(対照) | 49.16 | 7.45 | 16.46 | 3.46 | 32.71 | 4.06 |
| CR001262(対照) | 63.33 | 5.66 | 59.88 | 4.92 | 3.45 | 0.86 |
| CR001263(対照) | 39.19 | 6.98 | 37.59 | 8.01 | 1.60 | 1.92 |
| CR001264(対照) | 57.09 | 12.14 | 47.47 | 9.25 | 9.61 | 2.89 |
| CR003335 | 37.19 | 2.12 | 32.96 | 1.67 | 4.23 | 0.59 |
| CR003336 | 31.31 | 5.47 | 30.48 | 5.10 | 0.83 | 0.75 |
| CR003337 | 61.93 | 2.68 | 59.28 | 2.11 | 2.65 | 1.39 |
| CR003338 | 68.00 | 6.09 | 65.40 | 6.78 | 2.60 | 1.17 |
| CR003339 | 68.21 | 7.67 | 12.37 | 1.47 | 55.84 | 6.31 |
| CR003340 | 37.76 | 6.01 | 6.12 | 1.95 | 31.65 | 4.07 |
| CR003341 | 15.60 | 5.49 | 9.94 | 3.38 | 5.66 | 2.13 |
| CR003342 | 11.06 | 6.71 | 10.78 | 6.69 | 0.28 | 0.03 |
| CR003343 | 45.41 | 15.20 | 40.05 | 10.79 | 5.36 | 5.20 |
| CR003344 | 33.43 | 6.11 | 29.81 | 5.09 | 3.62 | 1.13 |
| CR003345 | 10.58 | 9.25 | 6.12 | 5.38 | 4.45 | 3.87 |
| CR003346 | 0.13 | 0.05 | 0.07 | 0.02 | 0.05 | 0.03 |
| CR003347 | 22.57 | 10.94 | 21.08 | 11.19 | 1.49 | 0.90 |
| CR003348 | 38.44 | 10.45 | 17.04 | 5.04 | 21.40 | 5.89 |
| CR003349 | 8.36 | 2.19 | 4.46 | 1.75 | 3.91 | 0.76 |
| CR003350 | 29.60 | 5.17 | 25.16 | 4.56 | 4.44 | 0.67 |
| CR003351 | 57.54 | 5.67 | 31.98 | 2.63 | 25.57 | 3.08 |
| CR003352 | 44.28 | 8.71 | 39.51 | 7.10 | 4.77 | 1.79 |
| CR003353 | 60.40 | 11.37 | 56.71 | 9.95 | 3.68 | 1.45 |
| CR003354 | 5.36 | 3.94 | 4.84 | 3.41 | 0.53 | 0.71 |
| CR003355 | 15.80 | 5.38 | 12.36 | 4.23 | 3.44 | 1.16 |
| CR003356 | 9.39 | 1.82 | 5.67 | 1.03 | 3.72 | 0.92 |
| CR003357 | 45.83 | 10.66 | 42.37 | 8.47 | 3.46 | 2.28 |
| CR003358 | 35.93 | 7.34 | 28.66 | 7.76 | 7.27 | 1.77 |
| CR003359 | 64.44 | 14.90 | 48.79 | 14.32 | 15.65 | 1.94 |
| CR003360 | 41.31 | 12.23 | 38.94 | 10.60 | 2.38 | 1.78 |
| CR003361 | 14.05 | 4.79 | 11.47 | 4.35 | 2.58 | 0.43 |
| CR003362 | 17.44 | 4.34 | 16.50 | 4.86 | 0.94 | 0.52 |
| CR003363 | 42.65 | 9.90 | 28.58 | 6.95 | 14.07 | 3.01 |
| CR003364 | 51.88 | 7.67 | 31.03 | 2.67 | 20.85 | 5.03 |
| CR003365 | 46.88 | 15.78 | 35.77 | 13.49 | 11.11 | 2.30 |
| CR003366 | 54.69 | 9.10 | 46.20 | 8.98 | 8.49 | 1.11 |
| CR003367 | 45.55 | 8.19 | 24.28 | 6.57 | 21.27 | 1.62 |
| CR003368 | 51.55 | 8.60 | 48.34 | 9.87 | 3.22 | 1.36 |
| CR003369 | 22.62 | 4.01 | 17.11 | 4.47 | 5.51 | 2.52 |
| CR003370 | 28.51 | 6.94 | 24.88 | 6.17 | 3.62 | 1.45 |
| CR003371 | 15.91 | 4.17 | 14.07 | 4.02 | 1.84 | 0.22 |

【表６－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003372 | 14.57 | 2.47 | 12.14 | 2.08 | 2.42 | 0.40 |
| CR003373 | 17.69 | 8.41 | 15.92 | 6.44 | 1.77 | 1.97 |
| CR003374 | 5.43 | 0.53 | 5.12 | 0.62 | 0.31 | 0.36 |
| CR003375 | 2.06 | 0.04 | 1.96 | 0.06 | 0.10 | 0.03 |
| CR003376 | 14.41 | 3.01 | 14.16 | 2.93 | 0.24 | 0.10 |
| CR003377 | 16.30 | 2.85 | 15.29 | 2.59 | 1.02 | 0.59 |
| CR003378 | 8.16 | 3.83 | 6.82 | 3.43 | 1.34 | 0.61 |
| CR003379 | 19.74 | 4.24 | 17.70 | 4.30 | 2.04 | 0.33 |
| CR003380 | 17.08 | 2.48 | 14.78 | 1.18 | 2.30 | 1.36 |
| CR003381 | 6.81 | 3.48 | 6.18 | 3.82 | 0.63 | 0.44 |
| CR003382 | 1.73 | 0.14 | 1.58 | 0.12 | 0.15 | 0.03 |
| CR003383 | 6.35 | 1.67 | 6.19 | 1.68 | 0.16 | 0.04 |
| CR003384 | 3.37 | 0.88 | 3.12 | 0.94 | 0.25 | 0.09 |
| CR003385 | 53.94 | 9.41 | 46.32 | 10.66 | 7.62 | 1.29 |
| CR003386 | 2.71 | 0.76 | 2.15 | 0.77 | 0.56 | 0.53 |
| CR003387 | 1.39 | 0.15 | 1.27 | 0.17 | 0.12 | 0.02 |
| CR003388 | 9.33 | 4.47 | 7.76 | 4.56 | 1.56 | 0.10 |
| CR003389 | 31.84 | 6.09 | 27.27 | 5.96 | 4.57 | 1.21 |
| CR003390 | 24.88 | 4.96 | 22.44 | 3.41 | 2.44 | 2.25 |
| CR003391 | 48.78 | 14.41 | 48.28 | 14.44 | 0.50 | 0.52 |
| CR003392 | 14.64 | 5.25 | 14.32 | 4.95 | 0.33 | 0.36 |
| CR005298 | 42.65 | 10.94 | 21.29 | 8.16 | 21.36 | 2.87 |
| CR005299 | 38.61 | 5.57 | 36.32 | 3.99 | 2.30 | 2.11 |
| CR005300 | 64.34 | 9.55 | 53.20 | 6.59 | 11.15 | 3.33 |
| CR005301 | 37.04 | 5.32 | 33.39 | 3.85 | 3.65 | 1.89 |
| CR005302 | 33.21 | 2.19 | 30.93 | 2.43 | 2.29 | 0.24 |
| CR005303 | 21.63 | 6.05 | 20.55 | 5.80 | 1.08 | 0.25 |
| CR005304 | 62.82 | 3.28 | 8.07 | 1.22 | 54.75 | 4.27 |
| CR005305 | 13.51 | 3.58 | 12.30 | 3.49 | 1.21 | 0.84 |
| CR005306 | 24.07 | 5.24 | 21.20 | 5.03 | 2.87 | 1.10 |
| CR005307 | 22.03 | 3.86 | 7.70 | 1.35 | 14.33 | 4.15 |

【０５５１】

表７は、初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にエレクトロポレートされた試験したＴＴＲ　ｄｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表７－１】

表７：ｄｇＲＮＡを搭載したＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質をエレクトロポレートされた初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003335 | 72.20 | 4.53 | 69.70 | 4.36 | 2.50 | 0.30 |
| CR003336 | 39.17 | 3.04 | 38.43 | 3.20 | 0.70 | 0.17 |
| CR003337 | 54.27 | 2.70 | 53.23 | 3.05 | 1.30 | 0.26 |
| CR003338 | 83.03 | 4.84 | 80.87 | 4.63 | 2.13 | 0.25 |
| CR003339 | 43.00 | 2.66 | 8.93 | 1.86 | 34.07 | 1.72 |
| CR003340 | 12.03 | 1.55 | 5.60 | 1.32 | 6.50 | 0.53 |
| CR003341 | 11.43 | 0.71 | 7.03 | 0.50 | 4.40 | 1.21 |
| CR003342 | 32.77 | 3.63 | 31.87 | 3.28 | 0.90 | 0.35 |
| CR003343 | 77.10 | 2.21 | 75.63 | 2.01 | 1.50 | 0.36 |
| CR003344 | 39.40 | 3.86 | 33.30 | 2.52 | 6.10 | 1.31 |
| CR003345 | 48.07 | 6.24 | 34.53 | 2.95 | 13.57 | 3.74 |
| CR003346 | 35.67 | 1.80 | 20.83 | 1.65 | 14.83 | 1.66 |
| CR003347 | 82.30 | 5.93 | 81.97 | 5.98 | 0.43 | 0.15 |
| CR003348 | 28.53 | 1.79 | 11.30 | 2.46 | 17.27 | 0.86 |
| CR003349 | 4.10 | 0.17 | 2.33 | 0.46 | 1.87 | 0.25 |
| CR003350 | 28.13 | 3.50 | 22.40 | 2.41 | 5.73 | 1.22 |
| CR003351 | 51.77 | 5.11 | 30.83 | 3.32 | 20.97 | 2.43 |
| CR003352 | 29.83 | 4.18 | 25.63 | 3.67 | 4.30 | 0.56 |
| CR003353 | 84.83 | 4.68 | 82.23 | 4.05 | 2.63 | 0.74 |
| CR003354 | 2.50 | 0.36 | 2.43 | 0.32 | 0.03 | 0.06 |
| CR003355 | 12.53 | 1.54 | 10.60 | 2.36 | 1.97 | 1.17 |
| CR003356 | 9.97 | 2.68 | 7.80 | 2.01 | 2.23 | 0.85 |
| CR003357 | 36.23 | 4.02 | 35.47 | 4.11 | 0.77 | 0.61 |
| CR003358 | 5.70 | 1.42 | 4.93 | 1.36 | 0.80 | 0.26 |
| CR003359 | 63.77 | 7.07 | 56.33 | 5.81 | 7.50 | 1.35 |
| CR003360 | 32.23 | 3.09 | 31.67 | 2.97 | 0.63 | 0.31 |
| CR003361 | 4.10 | 0.36 | 3.73 | 0.42 | 0.37 | 0.06 |
| CR003362 | 7.03 | 1.30 | 6.87 | 1.20 | 0.20 | 0.20 |
| CR003363 | 9.43 | 8.22 | 7.80 | 6.86 | 1.63 | 1.44 |
| CR003364 | 23.30 | 5.20 | 16.93 | 4.96 | 6.53 | 0.55 |
| CR003365 | 42.37 | 3.88 | 35.57 | 1.88 | 6.83 | 2.00 |
| CR003366 | 34.70 | 3.26 | 31.63 | 2.98 | 3.10 | 1.15 |
| CR003367 | 39.20 | 5.31 | 22.93 | 4.14 | 16.37 | 1.46 |
| CR003368 | 28.47 | 3.29 | 27.63 | 2.90 | 0.80 | 0.66 |
| CR003369 | 3.67 | 1.16 | 3.30 | 1.06 | 0.40 | 0.20 |
| CR003370 | 15.27 | 1.75 | 14.43 | 1.72 | 0.90 | 0.20 |
| CR003371 | 16.20 | 2.13 | 14.47 | 2.37 | 1.87 | 0.81 |
| CR003372 | 12.17 | 2.69 | 10.47 | 2.63 | 1.77 | 0.12 |
| CR003373 | 0.87 | 0.21 | 0.83 | 0.25 | 0.07 | 0.12 |
| CR003374 | 0.80 | 0.17 | 0.70 | 0.26 | 0.10 | 0.10 |
| CR003375 | 1.33 | 1.10 | 1.27 | 1.08 | 0.07 | 0.06 |

【表７－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003376 | 1.90 | 1.06 | 1.87 | 1.00 | 0.03 | 0.06 |
| CR003377 | 10.23 | 1.53 | 10.13 | 1.51 | 0.10 | 0.10 |
| CR003378 | 4.60 | 1.92 | 3.87 | 1.19 | 0.73 | 0.67 |
| CR003379 | 6.57 | 1.00 | 6.30 | 0.70 | 0.27 | 0.31 |
| CR003380 | 5.37 | 2.57 | 5.27 | 2.54 | 0.10 | 0.10 |
| CR003381 | 6.20 | 2.74 | 5.83 | 2.61 | 0.50 | 0.10 |
| CR003382 | 8.40 | 2.07 | 8.10 | 1.87 | 0.43 | 0.21 |
| CR003383 | 8.57 | 0.75 | 3.37 | 0.67 | 5.27 | 0.46 |
| CR003384 | 1.87 | 0.67 | 1.73 | 0.57 | 0.23 | 0.12 |
| CR003385 | 40.87 | 6.86 | 38.43 | 6.41 | 2.53 | 0.45 |
| CR003386 | 4.90 | 1.20 | 4.47 | 1.14 | 0.47 | 0.25 |
| CR003387 | 1.87 | 0.25 | 1.70 | 0.26 | 0.20 | 0.10 |
| CR003388 | 5.70 | 0.40 | 5.47 | 0.40 | 0.27 | 0.12 |
| CR003389 | 27.67 | 2.76 | 27.20 | 2.88 | 0.50 | 0.36 |
| CR003390 | 15.97 | 3.86 | 15.80 | 3.99 | 0.23 | 0.15 |
| CR003391 | 29.77 | 3.85 | 29.57 | 3.85 | 0.27 | 0.06 |
| CR003392 | 4.13 | 1.21 | 4.00 | 1.15 | 0.17 | 0.06 |
| CR005298 | 39.90 | 2.92 | 22.37 | 3.04 | 17.57 | 0.42 |
| CR005299 | 8.65 | 0.78 | 8.30 | 0.99 | 0.35 | 0.21 |
| CR005300 | 57.47 | 1.69 | 53.47 | 1.86 | 4.10 | 0.92 |
| CR005301 | 25.37 | 1.65 | 24.00 | 2.26 | 1.60 | 0.82 |
| CR005302 | 61.10 | 5.20 | 60.10 | 4.77 | 1.00 | 0.46 |
| CR005303 | 53.57 | 8.52 | 53.07 | 8.36 | 0.53 | 0.47 |
| CR005304 | 67.00 | 5.80 | 5.53 | 1.37 | 61.63 | 6.98 |
| CR005305 | 3.83 | 0.78 | 3.53 | 0.61 | 0.40 | 0.17 |
| CR005306 | 9.43 | 1.63 | 8.07 | 2.17 | 1.37 | 0.72 |
| CR005307 | 8.17 | 1.20 | 5.20 | 0.87 | 3.00 | 0.82 |

【０５５２】

表８は、初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にトランスフェクトされた試験したＴＴＲおよび対照ｄｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表８－１】

表８：ｄｇＲＮＡを搭載したＳｐｙ　Ｃａｓ９をトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR001261 | 32.51 | 1.00 | 12.50 | 0.47 | 20.01 | 0.59 |
| CR001262 | 50.09 | 1.48 | 45.25 | 1.69 | 4.83 | 0.31 |
| CR001263 | 15.25 | 2.41 | 14.83 | 2.37 | 0.42 | 0.10 |
| CR001264 | 45.30 | 3.48 | 23.87 | 2.09 | 21.43 | 1.68 |
| CR003335 | 51.14 | 4.27 | 49.51 | 4.04 | 1.63 | 0.25 |
| CR003336 | 30.70 | 2.41 | 30.11 | 2.48 | 0.58 | 0.11 |
| CR003337 | 49.43 | 4.75 | 47.54 | 4.49 | 1.88 | 0.47 |
| CR003338 | 61.34 | 3.55 | 59.13 | 3.44 | 2.22 | 0.11 |
| CR003339 | 45.06 | 9.83 | 8.85 | 1.65 | 36.21 | 8.34 |
| CR003340 | 10.44 | 2.44 | 5.94 | 1.34 | 4.50 | 1.16 |
| CR003341 | 19.66 | 3.67 | 14.64 | 3.31 | 5.02 | 0.37 |
| CR003342 | 20.66 | 2.55 | 19.85 | 2.54 | 0.81 | 0.15 |
| CR003343 | 43.25 | 4.47 | 41.61 | 4.26 | 1.63 | 0.33 |
| CR003344 | 35.45 | 13.12 | 30.97 | 11.72 | 4.48 | 1.51 |
| CR003345 | 28.90 | 6.33 | 21.00 | 5.23 | 7.91 | 1.81 |
| CR003346 | 4.11 | 1.36 | 2.27 | 0.53 | 1.84 | 0.85 |
| CR003347 | 66.35 | 4.48 | 66.11 | 4.51 | 0.24 | 0.08 |
| CR003348 | 23.18 | 2.16 | 13.74 | 1.17 | 9.44 | 0.99 |
| CR003349 | 10.83 | 1.57 | 9.00 | 1.41 | 1.83 | 0.32 |
| CR003350 | 24.84 | 2.74 | 19.77 | 1.91 | 5.07 | 0.89 |
| CR003351 | 40.28 | 1.31 | 23.92 | 0.70 | 16.36 | 0.78 |
| CR003352 | 30.48 | 1.93 | 27.27 | 2.31 | 3.21 | 0.38 |
| CR003353 | 61.54 | 4.13 | 59.38 | 4.04 | 2.16 | 0.11 |
| CR003354 | 10.31 | 1.47 | 10.07 | 1.50 | 0.23 | 0.11 |
| CR003355 | 19.11 | 0.92 | 17.69 | 0.79 | 1.42 | 0.44 |
| CR003356 | 7.53 | 1.78 | 6.24 | 1.51 | 1.29 | 0.32 |
| CR003357 | 49.35 | 2.53 | 48.45 | 2.54 | 0.90 | 0.13 |
| CR003358 | 31.62 | 5.97 | 25.95 | 5.03 | 5.67 | 1.04 |
| CR003359 | 59.47 | 6.05 | 50.96 | 5.69 | 8.51 | 0.54 |
| CR003360 | 31.47 | 4.12 | 30.27 | 4.21 | 1.19 | 0.22 |
| CR003361 | 13.08 | 1.48 | 12.52 | 1.45 | 0.56 | 0.18 |
| CR003362 | 11.65 | 1.24 | 11.10 | 1.06 | 0.56 | 0.36 |
| CR003363 | 27.65 | 2.84 | 21.47 | 2.39 | 6.18 | 0.61 |
| CR003364 | 35.29 | 3.50 | 23.93 | 2.63 | 11.36 | 1.16 |
| CR003365 | 47.78 | 3.67 | 40.24 | 3.12 | 7.54 | 0.72 |
| CR003366 | 42.74 | 3.41 | 37.95 | 2.88 | 4.79 | 0.60 |
| CR003367 | 31.19 | 4.60 | 16.06 | 2.66 | 15.13 | 1.94 |
| CR003368 | 34.83 | 5.05 | 33.83 | 5.09 | 1.00 | 0.10 |
| CR003369 | 12.98 | 0.26 | 11.67 | 0.21 | 1.31 | 0.11 |
| CR003370 | 20.06 | 1.79 | 18.80 | 1.65 | 1.26 | 0.28 |
| CR003371 | 18.80 | 2.73 | 17.23 | 2.34 | 1.57 | 0.43 |

【表８－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003372 | 17.56 | 2.26 | 15.74 | 2.16 | 1.81 | 0.10 |
| CR003373 | 3.64 | 0.29 | 3.44 | 0.30 | 0.19 | 0.07 |
| CR003374 | 2.65 | 0.33 | 2.52 | 0.33 | 0.14 | 0.02 |
| CR003375 | 5.04 | 0.66 | 4.93 | 0.66 | 0.11 | 0.01 |
| CR003376 | 5.00 | 1.10 | 4.86 | 1.10 | 0.14 | 0.03 |
| CR003377 | 12.77 | 2.00 | 12.45 | 1.84 | 0.31 | 0.18 |
| CR003378 | 8.66 | 1.90 | 8.24 | 1.74 | 0.42 | 0.19 |
| CR003379 | 16.86 | 2.62 | 16.51 | 2.62 | 0.34 | 0.08 |
| CR003380 | 8.17 | 1.42 | 7.71 | 1.47 | 0.46 | 0.10 |
| CR003381 | 7.15 | 0.73 | 6.88 | 0.67 | 0.27 | 0.07 |
| CR003382 | 2.44 | 0.06 | 2.28 | 0.05 | 0.15 | 0.03 |
| CR003383 | 4.76 | 0.40 | 4.52 | 0.42 | 0.24 | 0.09 |
| CR003384 | 3.56 | 0.26 | 3.39 | 0.26 | 0.17 | 0.01 |
| CR003385 | 41.15 | 6.06 | 38.15 | 5.59 | 3.00 | 0.48 |
| CR003386 | 3.22 | 0.25 | 2.97 | 0.27 | 0.25 | 0.02 |
| CR003387 | 1.79 | 0.11 | 1.68 | 0.09 | 0.11 | 0.04 |
| CR003388 | 5.43 | 1.03 | 4.38 | 1.00 | 1.05 | 0.25 |
| CR003389 | 19.87 | 4.39 | 19.19 | 4.52 | 0.68 | 0.24 |
| CR003390 | 16.09 | 2.84 | 15.85 | 2.91 | 0.24 | 0.09 |
| CR003391 | 34.72 | 8.29 | 34.46 | 8.35 | 0.26 | 0.06 |
| CR003392 | 10.07 | 1.06 | 9.93 | 1.02 | 0.14 | 0.04 |
| CR005298 | 32.07 | 1.02 | 21.12 | 1.02 | 10.95 | 0.15 |
| CR005299 | 19.37 | 0.61 | 18.79 | 0.51 | 0.58 | 0.13 |
| CR005300 | 57.23 | 6.24 | 53.62 | 5.44 | 3.61 | 0.87 |
| CR005301 | 31.37 | 3.02 | 29.53 | 2.88 | 1.84 | 0.15 |
| CR005302 | 48.29 | 5.22 | 47.32 | 5.32 | 0.97 | 0.14 |
| CR005303 | 36.45 | 4.83 | 36.06 | 4.72 | 0.39 | 0.12 |
| CR005304 | 49.45 | 6.85 | 4.32 | 0.31 | 45.13 | 6.74 |
| CR005305 | 7.07 | 1.43 | 6.73 | 1.30 | 0.34 | 0.17 |
| CR005306 | 18.81 | 1.82 | 16.24 | 1.57 | 2.57 | 0.35 |
| CR005307 | 18.73 | 1.68 | 10.18 | 0.92 | 8.55 | 0.88 |

【０５５３】

表９は、初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）と共トランスフェクトされた試験したＴＴＲおよび対照ｄｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表９－１】

表９：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｄｇＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR001261 | 32.33 | 4.95 | 5.83 | 1.63 | 26.47 | 3.30 |
| CR001262 | 41.50 | 4.71 | 34.43 | 3.31 | 7.13 | 1.42 |
| CR001263 | 10.23 | 3.61 | 9.40 | 3.20 | 0.90 | 0.44 |
| CR001264 | 42.80 | 0.50 | 11.90 | 1.32 | 30.90 | 1.80 |
| CR003335 | 36.43 | 2.98 | 33.03 | 2.31 | 3.40 | 0.70 |
| CR003336 | 16.93 | 3.78 | 16.20 | 3.41 | 0.80 | 0.44 |
| CR003337 | 19.30 | 1.57 | 18.10 | 1.44 | 1.23 | 0.15 |
| CR003338 | 36.30 | 9.55 | 33.73 | 9.27 | 2.73 | 0.49 |
| CR003339 | 36.43 | 1.21 | 2.27 | 0.15 | 34.23 | 1.31 |
| CR003340 | 24.97 | 2.78 | 1.83 | 0.23 | 23.17 | 2.66 |
| CR003341 | 15.83 | 1.38 | 6.80 | 0.53 | 9.07 | 0.81 |
| CR003342 | 22.10 | 1.27 | 20.60 | 0.57 | 1.50 | 0.71 |
| CR003343 | 55.03 | 0.38 | 52.40 | 0.53 | 2.60 | 0.44 |
| CR003344 | 31.50 | 1.30 | 22.40 | 1.31 | 9.20 | 0.10 |
| CR003345 | 50.65 | 2.90 | 32.30 | 1.56 | 18.45 | 1.20 |
| CR003346 | 19.97 | 1.94 | 5.63 | 0.55 | 14.33 | 1.72 |
| CR003347 | 41.47 | 3.59 | 41.33 | 3.63 | 0.17 | 0.06 |
| CR003348 | 18.00 | 0.87 | 2.30 | 0.66 | 15.80 | 0.61 |
| CR003349 | 2.57 | 0.81 | 0.90 | 0.35 | 1.70 | 0.46 |
| CR003350 | 26.63 | 4.25 | 16.33 | 2.45 | 10.33 | 1.75 |
| CR003351 | 26.50 | 1.61 | 10.20 | 0.92 | 16.37 | 0.97 |
| CR003352 | 16.80 | 5.03 | 11.73 | 3.86 | 5.07 | 1.14 |
| CR003353 | 53.73 | 6.01 | 49.50 | 5.82 | 4.43 | 0.75 |
| CR003354 | 2.97 | 0.95 | 2.87 | 0.85 | 0.13 | 0.12 |
| CR003355 | 12.07 | 2.61 | 10.47 | 2.08 | 1.63 | 0.59 |
| CR003356 | 7.27 | 0.72 | 4.70 | 0.53 | 2.67 | 0.21 |
| CR003357 | 25.93 | 4.55 | 25.30 | 4.22 | 0.63 | 0.35 |
| CR003358 | 3.90 | 0.79 | 2.73 | 0.45 | 1.17 | 0.51 |
| CR003359 | 32.93 | 4.34 | 25.67 | 3.25 | 7.33 | 1.24 |
| CR003360 | 14.90 | 4.85 | 14.13 | 4.66 | 0.90 | 0.52 |
| CR003361 | 3.53 | 0.60 | 2.73 | 0.55 | 0.87 | 0.15 |
| CR003362 | 6.60 | 1.47 | 6.17 | 1.45 | 0.47 | 0.21 |
| CR003363 | 16.70 | 1.08 | 11.80 | 0.79 | 4.93 | 0.60 |
| CR003364 | 15.63 | 2.45 | 6.73 | 0.81 | 8.93 | 1.70 |
| CR003365 | 26.90 | 3.05 | 20.23 | 2.02 | 6.67 | 1.16 |
| CR003366 | 24.53 | 1.26 | 20.47 | 1.45 | 4.07 | 0.23 |
| CR003367 | 37.33 | 1.40 | 14.03 | 0.40 | 23.37 | 1.25 |
| CR003368 | 11.10 | 1.91 | 10.53 | 1.90 | 0.60 | 0.10 |
| CR003369 | 1.60 | 0.46 | 0.90 | 0.20 | 0.70 | 0.36 |
| CR003370 | 2.83 | 0.57 | 2.33 | 0.40 | 0.50 | 0.17 |
| CR003371 | 3.40 | 0.80 | 2.67 | 0.75 | 0.73 | 0.15 |

【表９－２】

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003372 | 1.77 | 0.75 | 1.13 | 0.57 | 0.63 | 0.23 |
| CR003373 | 1.40 | 0.36 | 1.00 | 0.35 | 0.37 | 0.12 |
| CR003374 | 0.27 | 0.21 | 0.27 | 0.21 | 0.03 | 0.06 |
| CR003375 | 1.27 | 0.64 | 1.23 | 0.58 | 0.03 | 0.06 |
| CR003376 | 2.83 | 0.81 | 2.73 | 0.81 | 0.13 | 0.06 |
| CR003377 | 17.53 | 6.35 | 16.97 | 6.11 | 0.57 | 0.25 |
| CR003378 | 9.80 | 1.37 | 8.50 | 1.21 | 1.37 | 0.15 |
| CR003379 | 13.20 | 1.18 | 12.00 | 1.05 | 1.27 | 0.15 |
| CR003380 | 2.93 | 0.58 | 2.47 | 0.57 | 0.47 | 0.15 |
| CR003381 | 4.07 | 1.21 | 3.33 | 0.96 | 0.73 | 0.25 |
| CR003382 | 0.97 | 0.25 | 0.97 | 0.25 | 0.00 | 0.00 |
| CR003383 | 15.70 | 3.22 | 2.07 | 0.35 | 13.70 | 2.82 |
| CR003384 | 1.70 | 0.62 | 1.50 | 0.56 | 0.20 | 0.10 |
| CR003385 | 36.77 | 0.70 | 33.23 | 0.74 | 3.60 | 0.26 |
| CR003386 | 8.27 | 1.63 | 8.20 | 1.57 | 0.13 | 0.06 |
| CR003387 | 7.87 | 1.58 | 7.80 | 1.64 | 0.03 | 0.06 |
| CR003388 | 12.97 | 1.30 | 11.87 | 1.21 | 1.17 | 0.25 |
| CR003389 | 44.27 | 1.72 | 41.47 | 1.59 | 2.83 | 0.15 |
| CR003390 | 20.23 | 2.08 | 18.73 | 1.92 | 1.60 | 0.17 |
| CR003391 | 15.47 | 5.87 | 15.20 | 5.72 | 0.30 | 0.10 |
| CR003392 | 2.43 | 0.55 | 2.37 | 0.59 | 0.07 | 0.06 |
| CR005298 | 15.70 | 2.79 | 4.13 | 0.87 | 11.60 | 2.00 |
| CR005299 | 9.43 | 0.68 | 8.93 | 0.68 | 0.60 | 0.00 |
| CR005300 | 31.53 | 3.44 | 27.60 | 2.77 | 3.97 | 0.76 |
| CR005301 | 6.77 | 1.44 | 5.47 | 0.96 | 1.40 | 0.61 |
| CR005302 | 34.80 | 7.17 | 33.67 | 7.01 | 1.13 | 0.21 |
| CR005303 | 35.50 | 5.90 | 35.00 | 5.81 | 0.50 | 0.10 |
| CR005304 | 45.27 | 4.71 | 0.83 | 0.15 | 44.47 | 4.57 |
| CR005305 | 7.53 | 1.06 | 5.93 | 1.10 | 1.60 | 0.10 |
| CR005306 | 9.97 | 0.38 | 7.13 | 0.23 | 2.87 | 0.12 |
| CR005307 | 12.90 | 2.43 | 3.67 | 0.61 | 9.30 | 1.80 |

【０５５４】

表１０は、初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にエレクトロポレートされた試験したＴＴＲ　ｄｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表１０】

表１０：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質およびｄｇＲＮＡをエレクトロポレートされた初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR003336 | 8.18 | 1.93 | 8.10 | 1.94 | 0.07 | 0.01 |
| CR003337 | 24.94 | 5.80 | 24.10 | 4.71 | 0.84 | 1.10 |
| CR003338 | 44.94 | 9.99 | 44.89 | 9.97 | 0.05 | 0.01 |
| CR003339 | 8.95 | 0.89 | 4.93 | 0.64 | 4.02 | 0.25 |
| CR003340 | 12.53 | 2.22 | 7.72 | 0.13 | 4.80 | 2.09 |
| CR003341 | 8.43 | 10.53 | 7.66 | 9.91 | 0.77 | 0.63 |
| CR003344 | 35.72 | 4.67 | 33.81 | 5.29 | 1.91 | 0.61 |
| CR003345 | 52.92 | 3.26 | 30.74 | 0.78 | 22.19 | 2.48 |
| CR003346 | 1.91 | 0.86 | 1.82 | 0.82 | 0.09 | 0.04 |
| CR003347 | 72.41 | 0.38 | 72.15 | 0.73 | 0.25 | 0.34 |
| CR003352 | 1.25 | 0.20 | 1.16 | 0.21 | 0.09 | 0.01 |
| CR003353 | 4.75 | 0.43 | 4.67 | 0.47 | 0.08 | 0.04 |
| CR003358 | 20.47 | 0.30 | 19.01 | 0.51 | 1.46 | 0.21 |
| CR003359 | 46.17 | 1.14 | 40.66 | 2.00 | 5.51 | 0.86 |
| CR003360 | 29.47 | 0.63 | 29.05 | 1.00 | 0.42 | 0.37 |
| CR003361 | 4.53 | 0.14 | 4.46 | 0.18 | 0.08 | 0.04 |
| CR003362 | 4.59 | 0.80 | 4.36 | 0.77 | 0.22 | 0.03 |
| CR003363 | 15.64 | 1.92 | 13.24 | 2.65 | 2.39 | 0.73 |
| CR003364 | 19.62 | 2.54 | 14.27 | 2.72 | 5.35 | 0.17 |
| CR003365 | 10.31 | 1.81 | 9.33 | 1.80 | 0.97 | 0.01 |
| CR003366 | 18.52 | 0.71 | 17.62 | 0.33 | 0.90 | 0.39 |
| CR003368 | 18.56 | 3.89 | 18.30 | 3.77 | 0.26 | 0.11 |
| CR003369 | 1.53 | 0.25 | 1.28 | 0.40 | 0.25 | 0.15 |
| CR003370 | 2.52 | 0.64 | 2.40 | 0.63 | 0.12 | 0.01 |
| CR003371 | 1.83 | 0.38 | 1.69 | 0.41 | 0.14 | 0.03 |
| CR003372 | 2.15 | 0.30 | 1.83 | 0.33 | 0.32 | 0.04 |
| CR003382 | 10.86 | 2.04 | 8.54 | 1.93 | 2.33 | 0.11 |
| CR003383 | 8.86 | 2.30 | 4.31 | 0.69 | 4.55 | 1.61 |
| CR003384 | 3.75 | 0.35 | 2.50 | 0.37 | 1.25 | 0.02 |
| CR003385 | 30.96 | 1.61 | 26.84 | 2.20 | 4.12 | 0.59 |
| CR003386 | 5.54 | 1.42 | 3.51 | 1.26 | 2.03 | 0.15 |
| CR003387 | 4.72 | 0.03 | 4.55 | 0.08 | 0.17 | 0.11 |
| CR003388 | 6.81 | 0.17 | 6.59 | 0.28 | 0.22 | 0.11 |
| CR003389 | 18.83 | 4.99 | 18.05 | 4.92 | 0.78 | 0.07 |
| CR003390 | 16.87 | 3.88 | 16.49 | 3.48 | 0.39 | 0.39 |
| CR003391 | 36.44 | 1.09 | 35.73 | 1.37 | 0.71 | 0.28 |
| CR003392 | 7.02 | 0.97 | 6.63 | 0.59 | 0.38 | 0.37 |
| CR005299 | 13.48 | 2.96 | 13.23 | 2.74 | 0.26 | 0.22 |
| CR005301 | 46.76 | 1.75 | 46.34 | 2.19 | 0.42 | 0.44 |
| CR005302 | 1.34 | 0.19 | 1.26 | 0.19 | 0.08 | 0.00 |
| CR005303 | 59.28 | 1.05 | 58.72 | 1.06 | 0.56 | 0.00 |
| CR005305 | 11.28 | 0.39 | 11.13 | 0.39 | 0.15 | 0.00 |
| CR005307 | 4.56 | 0.71 | 2.01 | 0.49 | 2.55 | 0.21 |

【０５５５】

表１１は、初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にエレクトロポレートされた試験したカニクイザル特異的ＴＴＲ　ｄｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表１１】

**表１１：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質およびカニクイザル特異的ｄｇＲＮＡをエレクトロポレートされた初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CR000689 | 24.41 | 1.67 | 18.11 | 2.41 | 6.30 | 0.93 |
| CR005364 | 27.70 | 0.74 | 0.58 | 0.29 | 27.11 | 0.60 |
| CR005365 | 64.94 | 2.03 | 0.10 | 0.04 | 64.85 | 2.05 |
| CR005366 | 77.00 | 1.17 | 0.33 | 0.27 | 76.67 | 0.99 |
| CR005367 | 50.79 | 0.53 | 0.53 | 0.25 | 50.26 | 0.36 |
| CR005368 | 27.60 | 2.07 | 0.33 | 0.45 | 27.27 | 2.32 |
| CR005369 | 42.01 | 0.33 | 8.09 | 0.55 | 33.92 | 0.31 |
| CR005370 | 63.52 | 3.21 | 0.59 | 0.33 | 62.93 | 2.88 |
| CR005371 | 8.42 | 0.69 | 0.31 | 0.12 | 8.10 | 0.57 |
| CR005372 | 17.98 | 1.39 | 0.83 | 0.77 | 17.16 | 0.71 |

【０５５６】

実施例３．ｓｇＲＮＡ配列のスクリーニング

複数の細胞種におけるＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのクロススクリーニング

ヒトおよび／またはカニクイザルＴＴＲを標的化する修飾ｓｇＲＮＡ形式のガイドを実施例１に記載されるような初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞に送達した。各細胞種にわたり各ガイド配列を含むｃｒＲＮＡについて編集パーセントを決定し、次にガイド配列を最も高い編集％に基づいて順位付けした。両方の細胞株における表２のガイド配列についてのスクリーニングデータを以下に列記する（表１２～１５）。

【０５５７】

表１２は、初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にトランスフェクトされた試験したＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表１２】

表１２：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質およびｓｇＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G000480 | 81.80 | 1.98 | 77.15 | 2.19 | 4.70 | 0.28 |
| G000481 | 46.90 | 1.71 | 27.77 | 3.88 | 19.43 | 4.76 |
| G000482 | 66.67 | 2.35 | 56.57 | 4.14 | 10.10 | 1.85 |
| G000483 | 47.90 | 6.56 | 19.57 | 3.37 | 28.50 | 3.25 |
| G000484 | 62.97 | 0.90 | 29.23 | 0.21 | 33.83 | 0.95 |
| G000485 | 56.07 | 3.37 | 53.07 | 2.84 | 3.13 | 0.60 |
| G000486 | 69.73 | 6.86 | 9.83 | 1.93 | 59.93 | 5.63 |
| G000487 | 67.30 | 2.75 | 65.27 | 3.41 | 2.07 | 1.06 |
| G000488 | 61.27 | 1.95 | 26.30 | 1.55 | 35.00 | 1.30 |
| G000489 | 60.17 | 2.75 | 51.07 | 3.18 | 9.43 | 0.45 |
| G000490 | 55.90 | 7.88 | 46.13 | 7.55 | 9.80 | 0.69 |
| G000491 | 74.30 | 1.55 | 70.27 | 2.37 | 4.33 | 0.72 |
| G000492 | 60.97 | 5.81 | 57.90 | 4.64 | 3.13 | 1.35 |
| G000493 | 41.40 | 3.08 | 38.90 | 3.29 | 2.67 | 0.35 |
| G000494 | 62.23 | 3.30 | 61.47 | 3.25 | 0.77 | 0.31 |
| G000495 | 50.80 | 1.85 | 45.80 | 1.25 | 5.37 | 0.64 |
| G000496 | 72.33 | 1.63 | 44.73 | 2.14 | 27.67 | 1.46 |
| G000497 | 59.67 | 1.40 | 51.10 | 1.14 | 8.73 | 0.71 |
| G000498 | 72.80 | 3.75 | 60.17 | 3.12 | 12.70 | 0.72 |
| G000499 | 66.40 | 3.55 | 65.23 | 3.72 | 1.17 | 0.38 |
| G000500 | 65.53 | 1.21 | 62.00 | 1.11 | 3.83 | 0.40 |
| G000501 | 60.93 | 1.91 | 55.13 | 1.43 | 6.00 | 0.56 |

【０５５８】

表１３は、初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）と共トランスフェクトされた試験したＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の１２．５ｎＭにおける平均および標準偏差を示す。

【表１３】

表１３：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡをトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G000480 | 73.28 | 0.61 | 59.85 | 0.13 | 13.47 | 0.51 |
| G000481 | 34.30 | 5.26 | 14.62 | 2.59 | 19.77 | 2.72 |
| G000482 | 40.93 | 3.95 | 27.70 | 2.92 | 13.25 | 0.97 |
| G000483 | 27.82 | 2.93 | 4.05 | 0.51 | 23.85 | 2.43 |
| G000484 | 43.37 | 6.79 | 13.98 | 2.61 | 29.48 | 4.15 |
| G000485 | 30.82 | 5.76 | 28.87 | 5.50 | 1.97 | 0.28 |
| G000486 | 59.13 | 5.62 | 2.82 | 0.86 | 56.37 | 4.92 |
| G000487 | 49.57 | 0.99 | 47.38 | 0.89 | 2.27 | 0.24 |
| G000488 | 49.40 | 5.05 | 11.98 | 1.40 | 37.48 | 3.68 |
| G000489 | 24.25 | 2.82 | 14.17 | 2.01 | 10.28 | 1.38 |
| G000490 | 24.72 | 2.35 | 19.38 | 2.04 | 5.38 | 0.41 |
| G000491 | 45.93 | 1.22 | 42.42 | 1.06 | 3.60 | 0.33 |
| G000492 | 34.65 | 2.21 | 32.45 | 2.01 | 2.22 | 0.25 |
| G000493 | 11.55 | 1.35 | 10.65 | 1.58 | 0.97 | 0.30 |
| G000494 | 26.22 | 4.03 | 25.17 | 3.89 | 1.07 | 0.15 |
| G000495 | 47.77 | 1.88 | 43.40 | 1.91 | 4.45 | 0.17 |
| G000496 | 63.30 | 2.60 | 11.08 | 2.10 | 52.25 | 0.67 |
| G000497 | 40.33 | 3.32 | 34.48 | 2.71 | 5.85 | 0.61 |
| G000498 | 60.02 | 5.42 | 45.20 | 4.34 | 14.90 | 1.08 |
| G000499 | 39.30 | 6.04 | 38.58 | 5.86 | 0.77 | 0.12 |
| G000500 | 35.50 | 0.61 | 32.47 | 0.49 | 3.10 | 0.18 |
| G000501 | 40.32 | 1.50 | 33.82 | 2.04 | 6.62 | 0.55 |
| G000567 | 27.28 | 7.59 | 17.35 | 4.72 | 10.02 | 2.94 |
| G000568 | 43.75 | 5.83 | 43.00 | 5.81 | 0.80 | 0.18 |
| G000570 | 68.42 | 3.64 | 68.08 | 3.61 | 0.35 | 0.00 |
| G000571 | 20.47 | 3.41 | 14.47 | 2.72 | 6.13 | 0.78 |
| G000572 | 55.42 | 8.13 | 41.62 | 6.48 | 13.85 | 1.60 |

【０５５９】

表１４は、初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にエレクトロポレートされた試験したＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。ガイドＧ０００４８０およびＧ０００４８８はカニクイザルに対して１つのミスマッチを有し、カニクイザル細胞において編集効率を劣化させる可能性があることに留意されたい。

【表１４】

**表１４：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質およびｓｇＲＮＡをエレクトロポレートされた初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G000480 | 10.20 | 0.56 | 9.83 | 0.81 | 0.37 | 0.25 |
| G000481 | 69.13 | 8.62 | 33.73 | 2.67 | 35.50 | 11.23 |
| G000482 | 75.17 | 2.34 | 55.23 | 2.00 | 20.03 | 0.85 |
| G000485 | 22.93 | 0.95 | 22.00 | 0.82 | 1.07 | 0.21 |
| G000486 | 79.90 | 0.79 | 11.90 | 0.85 | 68.07 | 0.35 |
| G000488 | 9.63 | 0.50 | 5.37 | 0.38 | 4.27 | 0.35 |
| G000489 | 67.53 | 1.15 | 53.53 | 1.56 | 14.17 | 0.64 |
| G000490 | 61.67 | 0.72 | 54.47 | 1.10 | 7.27 | 1.23 |
| G000491 | 66.20 | 1.11 | 64.37 | 0.47 | 1.90 | 0.70 |
| G000493 | 50.13 | 0.74 | 48.07 | 1.69 | 2.10 | 0.98 |
| G000494 | 81.53 | 0.71 | 79.57 | 0.49 | 2.07 | 0.67 |
| G000498 | 91.37 | 1.48 | 68.50 | 1.64 | 22.87 | 1.50 |
| G000499 | 83.40 | 0.36 | 82.00 | 0.20 | 1.43 | 0.55 |
| G000500 | 45.20 | 3.66 | 42.60 | 3.80 | 2.63 | 0.25 |

【０５６０】

表１５は、初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（ＲＮＰ）と共にエレクトロポレートされた試験したカニクイザル特異的ＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の平均および標準偏差を示す。

【表１５】

**表１５：Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質およびカニクイザル特異的ｓｇＲＮＡ（例えば、類似のヒトｇＲＮＡを有するもの；表３を参照）をエレクトロポレートされた初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | 編集%の平均 | 編集%の標準偏差 | 挿入%の平均 | 挿入%の標準偏差 | 欠失%の平均 | 欠失%の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G000502 | 95.10 | 0.96 | 13.97 | 1.69 | 81.27 | 2.60 |
| G000503 | 58.53 | 2.40 | 52.07 | 1.68 | 6.50 | 2.46 |
| G000504 | 77.17 | 0.96 | 69.73 | 1.29 | 7.53 | 0.57 |
| G000505 | 95.53 | 1.06 | 95.50 | 1.01 | 0.10 | 0.10 |
| G000506 | 89.43 | 1.36 | 86.90 | 1.64 | 3.07 | 0.42 |
| G000507 | 71.17 | 3.22 | 67.03 | 2.39 | 4.60 | 1.65 |
| G000508 | 45.63 | 3.01 | 41.57 | 2.95 | 4.17 | 0.91 |
| G000509 | 93.03 | 0.81 | 43.60 | 1.30 | 49.73 | 1.76 |
| G000510 | 90.80 | 0.53 | 89.13 | 0.40 | 1.77 | 0.12 |
| G000511 | 62.77 | 1.63 | 60.87 | 1.55 | 2.00 | 0.35 |

【０５６１】

実施例４．Ｓｐｙ　Ｃａ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡを含有する脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）配合物のスクリーニング

初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを有

するＬＮＰ配合ＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのクロススクリーニング

【０５６２】

ヒトＴＴＲを標的化する修飾ｓｇＲＮＡおよびカニクイザルのマッチしたｓｇＲＮＡ配列の脂質ナノ粒子配合物を初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞について用量応答曲線において試験した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を実施例１に記載されるようにプレーティングした。両方の細胞株をＬＮＰでの処理の前に２４時間３７℃、５％の$CO_2$でインキュベートした。表１６～１９に詳述する実験において使用したＬＮＰをＮａｎｏａｓｓｅｍｂｌｒ（商標）の手順を使用して調製し、これは、それぞれが特定のｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）を含有し、それぞれが脂質を有していた。ＬＮＰは、４５：４４：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、４．５のＮ：Ｐ比を有していた。ＬＮＰを６％のカニクイザル血清を含有する肝細胞維持培地中３７℃で５分間インキュベートした。インキュベーション後に、１００ｎｇのｍＲＮＡで開始する８点の２倍の用量応答曲線でＬＮＰを初代ヒトまたはカニクイザル肝細胞に加えた。実施例１に記載されるようなＮＧＳ解析用の処理の７２時間後に細胞を溶解させた。各細胞種にわたり各ガイド配列を含むｃｒＲＮＡについて編集パーセントを決定し、次にガイド配列を１２．５ｎｇのｍＲＮＡインプットおよび３．９ｎＭのガイド濃度での最も高い編集％に基づいて順位付けした。両方の細胞株におけるガイド配列についての用量応答曲線を図４～７に示す。１２．５ｎｇのｍＲＮＡインプットおよび３．９ｎＭのガイド濃度での編集％を以下に列記する（表１６～１８）

【０５６３】

表１６は、用量応答曲線として初代ヒト肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の１２．５ｎｇのｃａｓ９　ｍＲＮＡにおける平均および標準偏差を示す。Ｇ０００５７０は、他のｓｇＲＮＡと比較して特徴的でない用量応答曲線を呈し、実験のアーチファクトの可能性がある。データを図４にグラフで示す。

【表１６】

表１６：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）およびｓｇＲＮＡで処理された初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 12.5ngのmRNA、3.9nMのsgRNA、編集%の平均 | 編集%の標準偏差 |
|---|---|---|
| G000480 | 59.33 | 0.73 |
| G000481 | 24.37 | 0.37 |
| G000482 | 19.10 | 2.64 |
| G000483 | 7.37 | 0.67 |
| G000484 | 16.67 | 1.23 |
| G000485 | 14.23 | 2.36 |
| G000486 | 61.33 | 2.59 |
| G000487 | 17.37 | 0.95 |
| G000488 | 44.80 | 3.00 |
| G000489 | 16.85 | 0.06 |
| G000490 | 10.53 | 1.90 |
| G000491 | 31.60 | 2.33 |
| G000492 | 15.87 | 0.44 |
| G000493 | 7.33 | 0.73 |
| G000494 | 6.37 | 1.07 |
| G000495 | 23.97 | 1.66 |
| G000496 | 30.73 | 3.76 |
| G000497 | 15.10 | 3.30 |
| G000498 | 24.43 | 1.30 |
| G000499 | 16.07 | 1.67 |
| G000500 | 23.57 | 2.44 |
| G000501 | 32.30 | 2.49 |
| G000567 | 48.95 | 1.06 |
| G000568 | 54.60 | 3.68 |
| G000570 | 88.30 | 1.84 |
| G000572 | 55.45 | 1.20 |

【０５６４】

表１７は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集%、挿入%（Ｉｎｓ）、および欠失%（Ｄｅｌ）の１２．５ｎｇのｍＮＲＡおよび３．９ｎＭのガイド濃度における平均および標準偏差を示す。データを図５にグラフで示す。

【表１７】

表１７：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）およびｓｇＲＮＡで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ

| ガイドID | 12.5ngのmRNA、3.9nMのsgRNA、編集%の平均 | 編集%の標準偏差 |
|---|---|---|
| G000480 | 0.73 | 0.15 |
| G000481 | 49.20 | 1.39 |
| G000482 | 26.13 | 5.33 |
| G000483 | 0.73 | 0.60 |
| G000484 | 0.10 | 0.00 |
| G000485 | 1.43 | 1.02 |
| G000489 | 31.87 | 2.40 |
| G000490 | 15.23 | 1.08 |
| G000491 | 6.37 | 0.38 |
| G000492 | 0.70 | 0.28 |
| G000493 | 7.63 | 1.14 |
| G000494 | 14.30 | 1.06 |
| G000495 | 0.73 | 0.06 |
| G000497 | 0.23 | 0.06 |
| G000498 | 37.90 | 1.42 |
| G000499 | 14.63 | 0.70 |
| G000500 | 10.47 | 0.32 |
| G000501 | 1.37 | 0.31 |
| G000567 | 0.10 | 0.00 |
| G000568 | 9.25 | 0.21 |
| G000570 | 17.30 | 0.85 |
| G000571 | 20.20 | 2.26 |
| G000572 | 30.60 | 0.42 |

【０５６５】

表１８は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したカニクイザル特異的ＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについての編集％、挿入％（Ｉｎｓ）、および欠失％（Ｄｅｌ）の１２．５ｎｇのｍＲＮＡおよび３．９ｎＭのガイド濃度における平均および標準偏差を示す。データを図６にグラフで示す。

【表１８】

**表１８：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）およびカニクイザルのマッチしたｓｇＲＮＡで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | 12.5ngのmRNA、3.9nMのsgRNA、編集% | 編集%の標準偏差 |
|---|---|---|
| G000502 | 80.70 | 0.14 |
| G000506 | 60.13 | 0.70 |
| G000509 | 74.47 | 7.28 |
| G000510 | 61.87 | 2.54 |

【０５６６】

初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共にＬＮＰに配合されたＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのクロススクリーニング

ヒトＴＴＲを標的化する修飾ｓｇＲＮＡおよびカニクイザルのマッチしたｓｇＲＮＡ配列の脂質ナノ粒子配合物を初代ヒト肝細胞および初代カニクイザル肝細胞について用量応答曲線において試験した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を実施例１に記載されるようにプレーティングした。両方の細胞株をＬＮＰでの処理の前に２４時間３７℃、５％の$CO_2$でインキュベートした。表２０～２２に詳述する実験において使用したＬＮＰを上記したクロスフロー手順を使用して調製したが、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して精製し、Ａｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ）を使用して濃縮し、これは、それぞれが特定のｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有していた。ＬＮＰは、５０：３８：９：３のモル比でリピドA、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、６．０のＮ：Ｐ比を有していた。ＬＮＰを６％のカニクイザル血清を含有する肝細胞維持培地中３７℃、５％の$CO_2$で５分間インキュベートした。インキュベーション後に、３００ｎｇのｍＲＮＡで開始する８点の３倍の用量応答曲線でＬＮＰを初代ヒトまたはカニクイザル肝細胞に加えた。実施例１に記載されるようなＮＧＳ解析用の処理の７２時間後に細胞を溶解させた。各細胞種にわたり各ガイド配列を含むｃｒＲＮＡについて編集パーセントを決定し、次にガイド配列をＥＣ５０値および最大編集パーセントに基づいて順位付けした。両方の細胞株におけるガイド配列についての用量応答曲線データを図４～７に示す。ＥＣ５０値および最大編集パーセントを以下に列記する（表１９～２２）。

【０５６７】

表１９は、用量応答曲線として初代ヒト肝細胞におけるU枯渇Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したヒト特異的ＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのＥＣ５０および最大編集を示す。データを図４にグラフで示す。

【表１９】

**表１９：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびヒト特異的ｓｇＲＮＡで処理された初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | EC50 | 最大編集 |
|---|---|---|
| G000480 | 0.10 | 98.69 |
| G000481 | 1.43 | 87.05 |
| G000482 | 0.65 | 97.02 |
| G000483 | 1.88 | 77.39 |
| G000484 | 0.95 | 94.14 |
| G000488 | 0.72 | 95.83 |
| G000489 | 1.38 | 86.33 |
| G000490 | 1.52 | 94.16 |
| G000493 | 2.42 | 63.95 |
| G000494 | 1.28 | 75.70 |
| G000499 | 0.63 | 96.31 |
| G000500 | 0.39 | 88.70 |
| G000568 | 0.78 | 95.72 |
| G000570 | 0.23 | 98.22 |
| G000571 | 2.21 | 71.28 |
| G000572 | 0.42 | 97.94 |

【０５６８】

表２０は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞におけるＵ枯渇Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したヒト特異的ＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのＥＣ５０および最大編集を示す。データを図１６にグラフで示す。

【表２０】

**表２０：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびヒト特異的ｓｇＲＮＡで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | EC50 | 最大編集 |
|---|---|---|
| G000480 | 5.28 | 20.32 |
| G000481 | 0.93 | 95.07 |
| G000482 | 0.89 | 97.47 |
| G000483 | 4.40 | 56.52 |
| G000484 | 3.47 | 0.22 |
| G000488 | 11.56 | 21.63 |
| G000489 | 1.79 | 89.21 |
| G000490 | 3.09 | 90.76 |
| G000493 | 4.97 | 61.15 |
| G000494 | 2.77 | 60.84 |
| G000499 | 2.00 | 74.94 |
| G000500 | 4.42 | 58.04 |
| G000567 | 1.76 | 97.06 |
| G000568 | 1.87 | 87.93 |
| G000570 | 2.00 | 96.73 |
| G000571 | 1.55 | 97.03 |
| G000572 | 0.79 | 100.31 |

【０５６９】

表２１は、用量応答曲線として初代ヒト肝細胞におけるＵ枯渇Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したカニクイザルのマッチしたＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのＥＣ５０および最大編集を示す。データを図１７にグラフで示す。

【表２１】

**表２１：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびカニクイザル特異的ｓｇＲＮＡで処理された初代ヒト肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | EC50 | 最大編集 |
|---|---|---|
| G000502 | 0.70 | 91.50 |
| G000504 | 5.16 | 7.16 |
| G000505 | 3.57 | 13.48 |
| G000506 | 1.26 | 89.49 |

【０５７０】

表２２は、用量応答曲線として初代カニクイザル肝細胞におけるＵ枯渇Ｓｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡと共に脂質ナノ粒子中に配合された試験したカニクイザルのマッチしたＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのＥＣ５０および最大編集を示す。データを図１８にグラフで示す。

【表２２】

**表２２：ＬＮＰに配合されたＳｐｙ　Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびカニクイザル特異的ｓｇＲＮＡで処理された初代カニクイザル肝細胞におけるＴＴＲ編集データ**

| ガイドID | EC50 | 最大編集 |
|---|---|---|
| G000502 | 0.26 | 100.05 |
| G000503 | 2.26 | 83.41 |
| G000504 | 1.42 | 98.04 |
| G000505 | 1.10 | 99.97 |
| G000506 | 0.66 | 99.18 |

【０５７１】

実施例５．ＴＴＲ　ｄｇＲＮＡおよびｓｇＲＮＡのオフターゲット解析

ＴＴＲガイドのオフターゲット解析

オリゴ挿入ベースのアッセイ（例えば、Ｔｓａｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　３３，　１８７－１９７；　２０１５を参照）を使用して、ＴＴＲを標的化するＣａｓ９により切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。表１の４５個のｄｇＲＮＡ（および既知のオフターゲットプロファイルを有する２つの対照ガイド）をＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞においてスクリーニングした。ＳｐｙＣａｓ９を構成的に発現するヒト胎児腎臓腺癌細胞株ＨＥＫ２９３（「ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９」）を、１０％のウシ胎児血清および５００μｇ／ｍｌのＧ４１８を添加したＤＭＥＭ培地中で培養した。細胞をトランスフェクションの２４時間前に９６ウェルプレートに３０，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングした。製造業者のプロトコールにしたがって細胞にＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．　１３７７８１５０）をトランスフェクトした。細胞に（１０ｎＭの）Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（０．３μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍと共に個々のｃｒＲＮＡ（１５ｎＭ）、ｔｒＲＮＡ（１５ｎＭ）、およびドナーオリゴを含有するリポプレックスをトランスフェクトした。トランスフェクションの２４時間後に細胞を溶解し、製造業者の推奨するプロトコールにしたがってＺｙｍｏのＱｕｉｃｋ　ｇＤＮＡ　９６　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（カタログ＃　Ｄ３０１２）を使用してゲノムＤＮＡを抽出した。Ｑｕｂｉｔ　Ｈｉｇｈ　Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ｄｓＤＮＡ　ｋｉｔ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用してｇＤＮＡを定量化した。軽微な変更と共にＴｓａｉ　ｅｔ　ａｌ，　２０１５に以前に記載された方法にしたがってライブラリーを調製した。ＩｌｌｕｍｉｎａのＭｉＳｅｑおよびＨｉＳｅｑ　２５００によりシークエンシングを行った。アッセイによりｃｒＲＮＡの一部について潜在的なオフターゲット部位を同定し、それを図２にプロットしている。

【０５７２】

表２３は、二本鎖ＤＮＡオリゴドナー配列と共にＴＴＲ　ｄｇＲＮＡをトランスフェクトされたＨｅｋＣａｓ９細胞において検出されたオフターゲット組込み部位の数を示す。

【表２３】

**表２３：オリゴ挿入ベースのアッセイを介してＴＴＲ　ｄｇＲＮＡについて検出されたオフターゲット組込み部位の数**

| ガイドID | 部位数 |
|---|---|
| CR003335 | 0 |
| CR003336 | 2 |
| CR003337 | 10 |
| CR003338 | 2 |
| CR003339 | 3 |
| CR003340 | 0 |
| CR003342 | 0 |
| CR003343 | 2 |
| CR003344 | 0 |
| CR003345 | 0 |
| CR003346 | 0 |
| CR003347 | 1 |
| CR003348 | 3 |
| CR003351 | 1 |
| CR003352 | 2 |
| CR003353 | 2 |
| CR003355 | 1 |
| CR003356 | 4 |
| CR003357 | 3 |
| CR003359 | 6 |
| CR003360 | 0 |
| CR003363 | 4 |
| CR003365 | 3 |
| CR003366 | 1 |
| CR003367 | 1 |
| CR003368 | 2 |
| CR003369 | 2 |
| CR003377 | 0 |
| CR003380 | 0 |
| CR003382 | 34 |
| CR003383 | 1 |
| CR003385 | 3 |
| CR003386 | 1 |
| CR003387 | 6 |
| CR003388 | 2 |
| CR003389 | 2 |
| CR003390 | 1 |
| CR003391 | 0 |
| CR003392 | 0 |
| CR005298 | 0 |
| CR005300 | 0 |
| CR005301 | 0 |
| CR005302 | 1 |
| CR005303 | 1 |
| CR005304 | 0 |

【０５７３】

さらに、上記したオリゴベースの挿入方法を介してＨｅｋ＿Ｃａｓ９細胞における修飾ｓｇＲＮＡとしてのオフターゲット可能性についてガイドのサブセットを評価した。オフターゲットの結果を図４にプロットした。

【０５７４】

表２４は、二本鎖ＤＮＡオリゴドナー配列と共にＴＴＲ　ｓｇＲＮＡをトランスフェクトされたＨｅｋＣａｓ９細胞において検出されたオフターゲット組込み部位の数を示す。

【表２４】

**表２４：挿入検出方法を介してＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについて検出されたオフターゲット組込み部位の数**

| ガイド ID | 部位数 |
|---|---|
| G000480 | 11 |
| G000481 | 3 |
| G000482 | 13 |
| G000483 | 5 |
| G000484 | 7 |
| G000485 | 22 |
| G000486 | 12 |
| G000487 | 14 |
| G000488 | 0 |
| G000489 | 19 |
| G000490 | 12 |
| G000491 | 28 |
| G000492 | 97 |
| G000493 | 7 |
| G000494 | 4 |
| G000495 | 13 |
| G000496 | 1 |
| G000497 | 26 |
| G000498 | 82 |
| G000499 | 4 |
| G000500 | 46 |
| G000501 | 4 |
| G000567 | 9 |
| G000568 | 937 |
| G000570 | 19 |
| G000571 | 16 |
| G000572 | 15 |

【０５７５】

実施例６．潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的化されたシークエンシング

潜在的なオフターゲットを検出するために実施例５において使用したＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞はＣａｓ９を構成的に過剰発現し、様々な細胞種において一過性の送達パラダイムと比較して潜在的なオフターゲット「ヒット」のより高い数をもたらす。さらに、ｓｇＲＮＡ（ｄｇＲＮＡと対照的に）を送達する場合、ｓｇＲＮＡ分子はｄｇＲＮＡより安定であるので（特に、化学的に修飾された場合）、潜在的なオフターゲットヒットの数はさらに増大し得る。したがって、実施例５において使用したようなオリゴ挿入方法により同定された潜在的なオフターゲット部位は、同定された潜在的なオフターゲット部位の標

的化されたシークエンシングを使用して検証され得る。

【０５７６】

１つのアプローチでは、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡおよび目的のｓｇＲＮＡ（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するｓｇＲＮＡ）を含むＬＮＰを用いて初代肝細胞を処理する。初代肝細胞を次に溶解し、（１つまたは複数の）潜在的なオフターゲット部位に隣接するプライマーを使用して、ＮＧＳ解析用のアンプリコンを生成する。ある特定のレベルにおけるインデルの同定は、潜在的なオフターゲット部位を実証し得る一方、潜在的なオフターゲット部位において見出されるインデルの欠如は、ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９細胞アッセイにおける偽陽性を指し示し得る。

【０５７７】

実施例７．表現型解析

分泌されたＴＴＲのウエスタンブロット解析

肝細胞癌細胞株ＨｅｐＧ２に表１からの選択ガイドを３連で実施例１に記載したようにトランスフェクトした。トランスフェクションの２日後に、ゲノムＤＮＡおよび編集効率についてのＮＧＳシークエンシングによる解析のために１つの複製物を回収した。トランスフェクションの５日後に、血清を含まない培地を１つの複製物において置き換えた。４時間後、以前に記載したようなＷＢによる分泌されたＴＴＲの分析のために培地を回収した。各ガイドについての編集％および細胞外ＴＴＲの低減についてのデータを図７に提供する。

【０５７８】

細胞内ＴＴＲのウエスタンブロット解析

肝細胞癌細胞株ＨＵＨ７に表１のガイドを含むｃｒＲＮＡを実施例１に記載したようにトランスフェクトした。細胞のトランスフェクトされたプールを組織培養物中に保持し、さらなる分析のために継代した。トランスフェクションの７日後に細胞を回収し、全細胞抽出物（ＷＣＥ）を調製し、以前に記載したようなウエスタンブロットによる分析に供した。

【０５７９】

ＷＣＥをＴＴＲタンパク質の低減についてウエスタンブロットにより分析した。全長ＴＴＲタンパク質は、約１６ｋＤの予測される分子量を有する。この分子量のバンドがウエスタンブロットの対照レーンにおいて観察された。

【０５８０】

Ｌｉｃｏｒ Ｏｄｙｓｓｅｙ Ｉｍａｇｅ Ｓｔｕｄｉｏ Ｖｅｒ５．２ソフトウェアを使用してＴＴＲタンパク質の低減パーセントを算出した。ＧＡＰＤＨをローディングコントロールとして使用し、ＴＴＲと同時にプロービングした。ＴＴＲバンドを包含する全領域と比較して各試料内のＧＡＰＤＨについてのデンシトメトリー値について比を算出した。比を対照レーンに対して正規化した後にＴＴＲタンパク質の低減パーセントを決定した。結果を図８に示す。

【０５８１】

実施例８．ヒト化ＴＴＲマウスおよびｗｔ（マウス）ＴＴＲを有するマウスへのＬＮＰの送達

ＴＴＲ遺伝子に関してヒト化されたマウスに、表２５に指し示すガイドを含有するＬＮＰ配合物７０１～７０４を投与した（５マウス／配合物）。これらのヒト化ＴＴＲマウスは、内因性のマウスＴＴＲ遺伝子座の領域が欠失され、オーソロガスヒトＴＴＲ配列で置換されていることにより、遺伝子座はヒトＴＴＲタンパク質をコードするように操作されていた。比較のために、マウスＴＴＲを有する６匹のマウスに、マウスＴＴＲを標的化するガイド（Ｇ０００２８２）を含有するＬＮＰ７００を投与した。表２５における配合物番号１～５のＬＮＰは、上記（ｄｅｓｃｔｉｂｅｄ ａｂｏｖｅ）したようにＮａｎｏａｓｓｅｍｂｌｒ（商標）手順を使用して調製し、配合物番号６～１６のＬＮＰは、上記したクロスフロー手順を使用して調製したが、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して精製し、Ａｍｉｃｏｎ遠心フィルターユ

ニット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｓｉｇｍａ）を使用して濃縮した。陰性対照として、対応する遺伝子型のマウスにビヒクル単独（トリス－生理食塩水－スクロース緩衝液（ＴＳＳ））の投与を行った。表２５における配合物番号（Ｎｕｍｅｒｓ）２～５のＬＮＰを投与されたヒト化ＴＴＲマウスのバックグラウンドは、５０％の１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃ、５０％のＣ５７ＢＬ／６ＮＴａｃであり、表２５における配合物番号６～１６を有するＬＮＰを投与されたヒト化ＴＴＲマウスの他に、マウスＴＴＲを有するマウス（ＬＮＰ７００、配合物番号１を投与）のバックグラウンドは、７５％のＣ５７ＢＬ／６ＮＴａｃ、２５％の１２９Ｓ６／ＳｖＥｖＴａｃであった。

【表２５】

**表２５．ヒト化ＴＴＲマウスへの投与のためのＬＮＰ配合物**

| 配合物番号 | LNP | ガイド | RNA濃度(mg/ml) | N:P比 | モル比(それぞれ、リピドA、コレステロール、DSPC、およびPEG2k-DMG) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | LNP700 | G000282 | 0.53 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 2 | LNP701 | G000481 | 0.46 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 3 | LNP702 | G000489 | 0.61 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 4 | LNP703 | G000494 | 0.57 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 5 | LNP704 | G000499 | 0.59 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 6 | LNP1148 | G000481 | 0.73 | 4.5 | 45:44:9:2 |
| 7 | LNP1152 | G000499 | 0.45 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 8 | LNP1153 | G000482 | 0.53 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 9 | LNP1155 | G000571 | 0.70 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 10 | LNP1156 | G000572 | 0.58 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 11 | LNP1157 | G000480 | 0.84 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 12 | LNP1159 | G000488 | 0.79 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 13 | LNP1160 | G000493 | 0.71 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 14 | LNP1161 | G000500 | 0.66 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 15 | LNP1162 | G000567 | 0.69 | 6.0 | 50:38:9:3 |
| 16 | LNP1163 | G000570 | 0.66 | 6.0 | 50:38:9:3 |

【０５８２】

配合物番号１～５を有するＬＮＰは配列番号：２のＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有し、配合物番号６～１６を有するＬＮＰは配列番号：１のＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有し、全てガイドに対して１：１の重量比であった。ＬＮＰは、表２５に記載されるモル比でリピドＡ、

コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有した。配合物番号１～５を有するＬＮＰを用いた投与は２ｍｇ／ｋｇ（全ＲＮＡ含有量）であり、配合物番号６～１６を有するＬＮＰを用いた投与は１ｍｇ／ｋｇ（全ＲＮＡ含有量）であった。ＮＧＳ解析用の目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して肝臓編集の結果を決定した。配合物番号１～５についての肝臓編集の結果を図９に示し、これは、試験した４つのガイドのそれぞれを用いた＞３５％の編集（平均値）のレベルでのヒトＴＴＲ配列の編集を指し示し、Ｇ０００４９４およびＧ０００４９９は６０％近くの値を提供する。配合物番号６～８、１０～１３、および１５～１６についての肝臓編集の結果を図１３および表２６に示し、これは、試験した各配合物を用いたヒトＴＴＲ配列の効率的な編集を示す。３８％より高い編集が全ての配合物について見られ、いくつかの配合物は６０％より高い編集値を提供した。配合物９および１４は、ＰＣＲアンプリコンの設計および結果として得られた少数のシークエンシングリードに起因して示していない。

【０５８３】

血清中のヒトＴＴＲのレベルを、配合物番号６～８、１０～１３、および１５～１６を提供されたマウスにおいて測定した。図１４Ｂを参照。図１４Ａは、比較目的のために提供した図１３の繰返しである。試験した各配合物について血清ヒトＴＴＲのノックダウンを検出し、これは、肝臓において検出された編集の量と相関した（図１４Ａ対図１４Ｂを参照、表２６）。

【表２６】

**表２６**

| ガイド ID | 編集% | 血清 TTR(TSS の%) |
|---|---|---|
| TSS(ビヒクル) | 0.06 | 100 |
| G481 | 61.28 | 10.52 |
| G499 | 65.66 | 8.39 |
| G482 | 70.86 | 4.65 |
| G572 | 73.52 | 2.11 |
| G480 | 77.34 | 3.48 |
| G488 | 59.125 | 27.78 |
| G493 | 38.55 | 49.73 |
| G567 | 47.525 | 44.24 |
| G570 | 45.5 | 41.73 |
| G571 | 33.88 | 11.39 |
| G500 | 44.44 | 34.28 |

【０５８４】

別のセットの実験において、ヒト化ＴＴＲマウスにガイドＧ０００４８０、Ｇ０００４８８、Ｇ０００４８９およびＧ０００５０２を含むある用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与した。配合物は、ガイドに対して１：１の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有した。ＬＮＰは、５０：３８：９：３のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、６のＮ：Ｐ比を有していた。投与は、１、０．３、０．１、または０．０３ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝５／群）であった。上記したクロスフロー手順を使用してＬＮＰを調製し、ＰＤ－１０カラムおよびＡｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニットを使用してそれぞれ精製および濃縮した。ＮＧＳ解析用の目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して肝臓編集の結果を決定し、血清ヒトＴＴＲレベルを上記のように測定した。肝臓編集についての結果を図２６Ａ、血清ヒトＴＴＲレベルについての結果を図２６Ｂ～Ｃに示す。編集および血清ＴＴＲレベルの両方についての用量応答は明らかであった。

【０５８５】
別のセットの実験において、ヒト化ＴＴＲマウスにガイドＧ０００４８１、Ｇ０００４８２、Ｇ０００４８６およびＧ０００４９９を含むある用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与した。配合物は、ガイドに対して１：１の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有した。ＬＮＰは、５０：３８：９：３のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、６のＮ：Ｐ比を有していた。投与は、１、０．３、または０．１ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝５／群）であった。上記したクロスフロー手順を使用してＬＮＰを調製し、ＰＤ－１０カラムおよびＡｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニットを使用してそれぞれ精製および濃縮した。ＮＧＳ解析用の目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して肝臓編集の結果を決定し、血清ヒトＴＴＲレベルを上記のように測定した。肝臓編集についての結果を図２７Ａに示し、血清ヒトＴＴＲレベルについての結果を図２７Ｂ～Ｃに示す。編集および血清ＴＴＲレベルの両方についての用量応答は明らかであった。

【０５８６】
別のセットの実験において、ヒト化ＴＴＲマウスにガイドＧ０００４８０、Ｇ０００４８１、Ｇ０００４８６、Ｇ０００４９９およびＧ０００５０２を含むある用量範囲にわたるＬＮＰ配合物を投与した。配合物は、ガイドに対して１：２の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有した。ＬＮＰは、５０：３８：９：３のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、６のＮ：Ｐ比を有していた。投与は、１、０．３、または０．１ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝５／群）であった。上記したクロスフロー手順を使用してＬＮＰを調製し、ＰＤ－１０カラムおよびＡｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニットを使用してそれぞれ精製および濃縮した。ＮＧＳ解析用の目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して肝臓編集の結果を決定し、血清ヒトＴＴＲレベルを上記のように測定した。肝臓編集についての結果を図２８Ａに示し、血清ヒトＴＴＲレベルについての結果を図２８Ｂ～Ｃに示す。編集および血清ＴＴＲレベルの両方についての用量応答は明らかであった。

【０５８７】
野生型ＣＤ－１マウスを使用する別々の実験において、マウスとカニクイザルとの間で相互相同的であるガイドＧ０００５０２を含むＬＮＰ配合物を用量応答試験において試験した。配合物は、ガイドに対して１：１の重量比でＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）を含有した。ＬＮＰは、４５：４４：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有し、６のＮ：Ｐ比を有していた。投与は、１、０．３、０．１、０．０３、または０．０１ｍｇ／ｋｇ（ｎ＝５／群）であった。ＮＧＳ解析用の目的の領域を増幅するように設計されたプライマーを使用して肝臓編集の結果を決定した。肝臓編集についての結果を図１５Ａに示し、血清マウスＴＴＲレベルについての結果を図１５Ｂに示す。編集および血清ＴＴＲレベルの両方についての用量応答は明らかであった。

【０５８８】
実施例９．複数の用量でのマウスへのＬＮＰの送達
マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙからの雌、約６～７週齢）に、１：１の重量比でＧ０００２８２（「Ｇ２８２」）およびＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：２）を含有し、０．５ｍｇ／ｍｌの全ＲＮＡ濃度の、上記したようなクロスフローおよびＴＦＦ手順を使用して調製したＬＮＰ配合物ＬＮＰ７０５を投与した。ＬＮＰは、４．５のＮ：Ｐ比を有し、４５：４４：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有した。群に週に１回で１、２、３、もしくは４週間まで（ＱＷｘ１～４）または月に１回で２もしくは３か月まで（ＱＭｘ２～３）投与を行った。投与量は０．５ｍｇ／ｋｇまたは１ｍｇ／ｋｇ（全ＲＮＡ含有量）であった。対照群には、０．５、１、または２ｍｇ／ｋｇの単回用量を１日目に与えた。各群は５匹のマウスを含有した。血清ＴＴＲをＥＬＩＳＡにより分析し、検死時に肝臓、脾臓および筋肉をＮＧＳ編集解析のためにそれぞれ回収した。群を表２７に示す。Ｘ＝屠

殺および検死。ＭＰＫ＝ｍｇ／ｋｇ。

【表２７】

**表２７．試験群**

| 群 | 継続時間/用量レジメン | 用量(MPK) | 与えた総用量(MPK) | 用量 1日目 | 用量 8日目 | 用量 15日目 | 用量 22日目 | NX 28日目 | 用量 43日目 | NX 49日目 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4週複数回用量/QWx4 | 0(TSS対照) | 0 | X | X | X | X | X | | |
| 2 | 2か月複数回用量/QMx3 | 1 | 3 | X | | | X | | X | X |
| 3 | | 0.5 | 1.5 | X | | | X | | X | X |
| 4 | 1か月複数回用量/QMx2 | 1 | 2 | X | | | X | X | | |
| 5 | | 0.5 | 1 | X | | | X | X | | |
| 6 | 4週複数回用量/QWx4 | 1 | 4 | X | X | X | X | X | | |
| 7 | | 0.5 | 2 | X | X | X | X | X | | |
| 8 | 3週複数回用量/QWx3 | 1 | 3 | | X | X | X | X | | |
| 9 | | 0.5 | 1.5 | | X | X | X | X | | |
| 10 | 2週複数回用量/QWx2 | 1 | 2 | | | X | X | X | | |
| 11 | | 0.5 | 1 | | | X | X | X | | |
| 12 | 単回用量/QWx1 | 1 | 1 | | | | X | X | | |
| 13 | | 0.5 | 0.5 | | | | X | X | | |
| 14 | | 2 | 2 | | | | 26日目 | 32日目 | | |

【０５８９】

表２８および図１０Ａ～図１１Ｂは血清ＴＴＲレベルの結果を示す（ＫＤ％＝ノックダウン％）。表２９および図１２Ａ～Ｃは肝臓編集の結果を示す。

【表２８】

**表２８．血清ＴＴＲの結果**

| 時間レジメン | 用量 | 血清 TTR(μg/mL) | 血清 TTR(KD%) |
|---|---|---|---|
| QWx4 | TSS | 1190.7 | – |
| QMx3 | 0.5 | 245.01 | 79.42 |
| QMx2 | 0.5 | 776.73 | 34.77 |
| QWx4 | 0.5 | 347.43 | 70.82 |
| QWx3 | 0.5 | 405.70 | 65.93 |
| QWx2 | 0.5 | 432.25 | 63.70 |
| QWx1 | 0.5 | 804.06 | 32.47 |
| QMx3 | 1 | 91.95 | 92.28 |
| QMx2 | 1 | 176.81 | 85.15 |
| QWx4 | 1 | 119.52 | 89.96 |
| QWx3 | 1 | 167.15 | 85.96 |
| QWx2 | 1 | 130.98 | 89.00 |
| QWx1 | 1 | 573.02 | 51.88 |
| QWx1 | 2 | 219.07 | 81.60 |

【表２９】

**表２９．肝臓編集の結果**

| 時間レジメン | 用量 | 肝臓編集(%) |
|---|---|---|
| QWx4 | TSS | 0.38 |
| QMx3 | 0.5 | 48.18 |
| QMx2 | 0.5 | 36.66 |
| QWx4 | 0.5 | 56.03 |
| QWx3 | 0.5 | 51.35 |
| QWx2 | 0.5 | 34.77 |
| QWx1 | 0.5 | 24.16 |
| QMx3 | 1 | 63.40 |
| QMx2 | 1 | 57.37 |
| QWx4 | 1 | 62.89 |
| QWx3 | 1 | 59.22 |
| QWx2 | 1 | 60.12 |
| QWx1 | 1 | 35.16 |
| QWx1 | 2 | 60.57 |

【０５９０】

結果は、ＴＴＲの編集レベルおよびＫＤ％の増加を達成するために、週毎または月毎の間隔などの経時的な複数回投与で累積用量および効果を構築できることを示す。

【０５９１】

実施例１０．ＲＮＡカーゴ：種々のｍＲＮＡおよびｇＲＮＡの比

この試験では、異なる比のｇＲＮＡ対ｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｖｏでの有効性をマウスにおいて評価した。配列番号：４のＯＲＦ、ＨＳＤ　５’ＵＴＲ、ヒトアルブミン３’ＵＴＲ、Ｋｏｚａｋ配列、およびポリＡテイルを有するＣｌｅａｎＣａｐ（商標）キャップ付加Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを、ウリジン三リン酸の代わりにＮ１－メチルシュードウリジン三リン酸を用いて実施例１に指し示すようにＩＶＴ合成により作製した。

【０５９２】

実施例１に記載されるように記載されたｍＲＮＡおよびＧ２８２（配列番号：１２４）から調製したＬＮＰ配合物は、５０：３８：９：３のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧを含み、６のＮ：Ｐ比を有していた。配合物のｇＲＮＡ：Ｃａｓ９　ｍＲＮＡの重量比は図１９Ａおよび図１９Ｂに示す通りであった。

【０５９３】

ｉｎ　ｖｉｖｏでの特徴付けのために、ＬＮＰを０．１ｍｇの全ＲＮＡ（ｍｇのガイドＲＮＡ＋ｍｇのｍＲＮＡ）／ｋｇでマウスに投与した（ｎ＝５／群）。投与の７～９日後に動物を屠殺し、血液および肝臓を回収し、血清ＴＴＲおよび肝臓編集を実施例１に記載されるように測定した。血清ＴＴＲおよび肝臓編集の結果を図１９Ａおよび図１９Ｂに示す。陰性対照マウスにＴＳＳビヒクルを投与した。

加えて、上記のＬＮＰを０．０５ｍｇのｍＲＮＡ／ｋｇの一定のｍＲＮＡ用量でマウスに投与し（ｎ＝５／群）、ｇＲＮＡ用量は０．０６ｍｇ／ｋｇ～０．４ｍｇ／ｋｇで異なった。投与の７～９日後に動物を屠殺し、血液および肝臓を回収し、血清ＴＴＲおよび肝臓編集を測定した。血清ＴＴＲおよび肝臓編集の結果を図１９Ｃおよび図１９Ｄに示す。

陰性対照マウスにＴＳＳビヒクルを投与した。

【０５９４】

実施例１１．初代ヒト肝細胞（Ｈｅｐａｔｏｃｙｅｓ）におけるＴＴＲ　ｓｇＲＮＡのオフターゲット解析

ＴＴＲを標的化するｓｇＲＮＡのオフターゲット解析を以下の修正と共に実施例５に記載されるように初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）において行った。ＰＨＨを実施例１に記載されるようにコラーゲンをコーティングした９６ウェルプレートに３３，０００細胞／ウェルの密度でプレーティングした。プレーティングの２４時間後に細胞を培地で洗浄し、実施例１に記載されるようにＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ．　１３７７８１５０）を使用してトランスフェクトを行った。細胞に１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有するリポプレックスをトランスフェクトし、直後に２５ｎＭのｓｇＲＮＡおよび１２．５ｎＭのドナーオリゴを含有する別のリポプレックス（０．３μＬ／ウェル）を加えた。細胞をトランスフェクションの４８時間後に溶解し、ｇＤＮＡを抽出し、実施例５にさらに記載されるように分析した。データを図２０にグラフで示す。

【０５９５】

表３０は、ＰＨＨにおいて検出されたオフターゲット組込み部位の数を示し、実施例５において使用したＨｅｋＣａｓ９細胞において検出された部位の数と比較している。ＨｅｋＣａｓ９細胞株と比較して試験したあらゆるガイドについてＰＨＨにおいてより少ない部位が検出され、単独でＰＨＨにおいて検出された特有の部位はなかった。

【表３０】

**表３０．オリゴ挿入ベースのアッセイを介してＰＨＨにおいてＴＴＲ　ｓｇＲＮＡについて検出されたオフターゲット組込み部位の数**

| ガイドID | PHHにおける部位数 | HekCas9細胞における部位数(実施例5) |
|---|---|---|
| G000480 | 2 | 11 |
| G000481 | 0 | 3 |
| G000482 | 2 | 13 |
| G000483 | 0 | 5 |
| G000484 | 0 | 7 |
| G000485 | 3 | 22 |
| G000486 | 0 | 12 |
| G000487 | 0 | 14 |
| G000488 | 0 | 0 |
| G000489 | 2 | 19 |
| G000490 | 0 | 12 |
| G000491 | 7 | 28 |
| G000492 | 5 | 97 |
| G000493 | 1 | 7 |
| G000494 | 0 | 4 |
| G000495 | 1 | 13 |
| G000496 | 0 | 1 |
| G000497 | 3 | 26 |
| G000498 | 19 | 82 |
| G000499 | 1 | 4 |
| G000500 | 12 | 46 |
| G000501 | 0 | 4 |
| G000567 | 0 | 9 |
| G000568 | 11 | 936 |
| G000570 | 1 | 19 |
| G000571 | 1 | 16 |
| G000572 | 2 | 15 |

【０５９６】

オリゴ挿入アッセイを介したＰＨＨにおける潜在的なオフターゲット部位の同定後、例えば、実施例６に記載されるように、標的化されたアンプリコンシークエンシングによりある特定の潜在的な部位をさらに評価した。オリゴ挿入戦略により同定された潜在的なオフターゲット部位に加えて、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ予測により同定された追加の潜在的なオフターゲット部位を解析に含めた。

【０５９７】

この目的のために、実施例４に記載されるように、１００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）および目的のｇＲＮＡを１４．６８ｎＭ（１：１の重量比）で含むＬＮＰでＰＨＨを処理した。上記したクロスフロー手順を使用してＬＮＰを調製し、ＰＤ－１０カラムおよびＡｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニットを使用してそれぞれ精製および濃縮した。ＬＮＰを６．０のＮ：Ｐ比を有するように配合し、このＬＮＰは、５０：３８：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有した。ＬＮＰでの処理後、単離したゲノムＤＮＡを（例えば、実施例１および６に

記載されるように）ＮＧＳにより解析して、インデルが潜在的なオフターゲット部位において検出できるかどうか（これはＣａｓ９媒介性の切断事象の指標となる）を決定した。表３１および表３２は、それぞれｇＲＮＡ　Ｇ０００４８０およびＧ０００４８６について評価した潜在的なオフターゲット部位を示す。

【０５９８】

図２１Ａ～Ｂおよび図２２Ａ～Ｂおよび以下の表３３に示すように、インデルは、Ｇ０００４８０についてオリゴ挿入アッセイにより同定された潜在的なオフターゲット部位の２つのみ、およびＧ０００４８６について１つのみについて低いレベルで検出された。いずれのガイドについてもｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ予測部位のいずれにおいてもインデルは検出されなかった。さらに、インデルはこれらの部位において飽和付近の用量のＬＮＰを使用してのみ検出され、Ｇ０００４８０およびＧ０００４８６についてオンターゲット部位において観察されたインデル率はそれぞれ約９７％および約９１％であった（表３３を参照）。これらの部位のゲノム座標もまた表３１および表３２に報告しており、それぞれは、いかなるタンパク質もコードしない配列に対応する。

【０５９９】

用量応答アッセイを次に行って、オフターゲットが検出されないＬＮＰの最大用量を決定した。ＰＨＨを実施例４に記載されるようにＧ０００４８０またはＧ０００４８６のいずれかを含むＬＮＰで処理した。用量は、ｇＲＮＡ濃度に関して１１点にわたった（０．００１ｎＭ、０．００２ｎＭ、０．００７ｎＭ、０．０２ｎＭ、０．０６ｎＭ、０．１９ｎＭ、０．５７ｎＭ、１．７２ｎＭ、５．１７ｎＭ、１５．５１ｎＭ、および４６．５５ｎＭ）。図２１Ａ～Ｂおよび図２２Ａ～Ｂにおける上下の破線により表されるように、Ｇ０００４８０およびＧ０００４８６について潜在的なオフターゲット部位がもはや検出されない最高濃度（ｇＲＮＡの濃度に関して）はそれぞれ０．５７ｎＭおよび１５．５１ｎＭであり、それぞれ８４．６０％および８９．５０％のオンターゲットインデル率を結果としてもたらした。

【表３１－１】

表31.標的化されたアンプリコンシークエンシングを介して評価された、GOOO480について挿入検出およびin silico予測を介して同定された潜在的なオフターゲット部位

| ガイドID | オフターゲット(OT)部位ID | 使用したアッセイ | 染色体座標(hg38) | 鎖 |
|---|---|---|---|---|
| GOOO480 | INS-OT.1 | 挿入検出 | chr7:94767406-94767426 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.2 | 挿入検出 | chr2:192658562-192658582 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.3 | 挿入検出 | chr7:4834390-4834410 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.4 | 挿入検出 | chr20:9216118-9216138 | － |
| GOOO480 | INS-OT.5 | 挿入検出 | chr10:12547071-12547091 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.6 | 挿入検出 | chr6:168377978-168377998 | － |
| GOOO480 | INS-OT.7 | 挿入検出 | chr12:114144669-114144689 | － |
| GOOO480 | INS-OT.8 | 挿入検出 | chr10:7376755-7376775 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.9 | 挿入検出 | chr2:52950299-52950319 | ＋ |
| GOOO480 | INS-OT.10 | 挿入検出 | chr8:56579165-56579185 | － |
| GOOO480 | INS-OT.11 | 挿入検出 | chr1:189992255-189992275 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.1 | in silico予測 | chr10:12547071-12547091 | ＋ |
| GOOO480 | PRE-DOT.2 | in silico予測 | chrX:119702782-119702802 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.3 | in silico予測 | chr1:116544586-116544606 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.4 | in silico予測 | chr6:88282884-88282904 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.6 | in silico予測 | chr5:121891868-121891888 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.7 | in silico予測 | chr3:52544945-52544965 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.8 | in silico予測 | chr15:36949639-36949659 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.9 | in silico予測 | chr5:33866486-33866506 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.10 | in silico予測 | chr5:159755754-159755774 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.11 | in silico予測 | chr5:31349859-31349879 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.12 | in silico予測 | chr11:79485652-79485672 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.13 | in silico予測 | chr15:29448864-29448884 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.14 | in silico予測 | chr5:171153565-171153585 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.15 | in silico予測 | chr9:84855273-84855293 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.16 | in silico予測 | chr6:159953060-159953080 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.17 | in silico予測 | chr16:51849024-51849044 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.18 | in silico予測 | chr3:24108809-24108829 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.19 | in silico予測 | chr18:41118310-41118330 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.20 | in silico予測 | chr10:108975241-108975261 | ＋ |
| GOOO480 | PREDO-T.21 | in silico予測 | chr1:44683633-44683653 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.22 | in silico予測 | chr2:196214849-196214869 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.23 | in silico予測 | chr9:117353544-117353564 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.24 | in silico予測 | chr1:55583322-55583342 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.25 | in silico予測 | chr12:28246827-28246847 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.26 | in silico予測 | chr4:54545361-54545381 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.27 | in silico予測 | chr13:22364836-22364856 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.28 | in silico予測 | chr13:80816049-80816069 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.29 | in silico予測 | chr7:39078622-39078642 | ＋ |
| GOOO480 | PRED-OT.30 | in silico予測 | chr2:59944386-59944406 | ＋ |

【表３１－２】

「INS-OT.N」は、オリゴ挿入により検出されたオフターゲット部位 ID を指し、N は上記に指定された整数である；「PRED-OT.N」は、in silico 法を介して予測されたオフターゲット部位 ID を指し、N は上記に指定された整数である。

【表３２－１】

表 32.標的化されたアンプリコンシークエンシングを介して評価された、GOOO486 についての挿入検出および in silico 予測を介して同定された潜在的なオフターゲット部位

| ガイド ID | オフターゲット(OT)部位 ID | 使用したアッセイ | 染色体座標(hg38) | 鎖 |
|---|---|---|---|---|
| GOOO486 | INS-OT.1 | 挿入検出 | chr14:77332157-77332177 | + |
| GOOO486 | INS-OT.2 | 挿入検出 | chr14:54672059-54672079 | − |
| GOOO486 | INS-OT.3 | 挿入検出 | chr4:108513169-108513189 | − |
| GOOO486 | INS-OT.4 | 挿入検出 | chr5:91397023-91397043 | − |
| GOOO486 | INS-OT.5 | 挿入検出 | chr9:116626135-116626155 | − |
| GOOO486 | INS-OT.6 | 挿入検出 | chr6:73201226-73201246 | + |
| GOOO486 | INS-OT.7 | 挿入検出 | chr16:89368352-89368372 | − |
| GOOO486 | INS-OT.8 | 挿入検出 | chr7:56308371-56308391 | − |
| GOOO486 | INS-OT.9 | 挿入検出 | chr21:43605667-43605687 | + |
| GOOO486 | INS-OT.10 | 挿入検出 | chr5:26758030-26758050 | + |
| GOOO486 | INS-OT.11 | 挿入検出 | chr17:30656428-30656448 | + |
| GOOO486 | INS-OT.12 | 挿入検出 | chr8:130486452-130486472 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.1 | in silico 予測 | chr11:44707064-44707084 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.2 | in silico 予測 | chr5:50775396-50775416 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.3 | in silico 予測 | chr4:141623949-141623969 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.4 | in silico 予測 | chr1:223481186-223481206 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.5 | in silico 予測 | chr6:39951487-39951507 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.6 | in silico 予測 | chrY:5456047-5456067 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.8 | in silico 予測 | chr6:129868719-129868739 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.9 | in silico 予測 | chrX:80450312-80450332 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.10 | in silico 予測 | chr7:27256771-27256791 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.11 | in silico 予測 | chr3:181416528-181416548 | + |
| GOOO486 | PRED-OT12 | in silico 予測 | chr7:146425020-146425040 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.13 | in silico 予測 | chr3:16980977-16980997 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.14 | in silico 予測 | chr7:118161002-118161022 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.15 | in silico 予測 | chr6:102220539-102220559 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.16 | in silico 予測 | chr12:127278991-127279011 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.17 | in silico 予測 | chr2:67686631-67686651 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.18 | in silico 予測 | chr1:114467665-114467685 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.19 | in silico 予測 | chr3:194514436-194514456 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.20 | in silico 予測 | chr14:31767581-31767601 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.21 | in silico 予測 | chr16:28706209-28706229 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.22 | in silico 予測 | chr8:110526279-110526299 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.23 | in silico 予測 | chr19:2899814-2899834 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.25 | in silico 予測 | chr3:130760261-130760281 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.26 | in silico 予測 | chr11:2506046-2506066 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.27 | in silico 予測 | chr2:153918318-153918338 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.28 | in silico 予測 | chr14:40590226-40590246 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.29 | in silico 予測 | chr18:806650-806670 | + |
| GOOO486 | PRED-OT.30 | in silico 予測 | chr2:117707480-117707500 | + |

【表３２－２】
「INS-OT.N」は、オリゴ挿入により検出されたオフターゲット部位IDを指し、Nは上記に指定された整数である；「PRED-OT.N」は、in silico法を介して予測されたオフターゲット部位IDを指し、Nは指定された整数である。

【表３３】
**表33.100ngのmRNAおよび31.03nMのgRNAを含有するLNPで処理したPHHにおいて検出されたオフターゲット部位**

| ガイドID | オフターゲット(OT)部位ID | 部位の種類 | インデル頻度(100ngのCas9 mRNAおよび14.68nMのgRNAを含むLNPを使用) | インデル頻度の標準偏差 |
|---|---|---|---|---|
| G000480 | n/a | オンターゲット | 97.33% | 1.10% |
| G000480 | INS-OT.2 | オフターゲット | 1.43% | 0.40% |
| G000480 | INS-OT.4 | オフターゲット | 0.97% | 0.25% |
| G000486 | n/a | オンターゲット | 91.33% | 1.97% |
| G000486 | INS-OT.4 | オフターゲット | 0.47% | 0.06% |

【０６００】
実施例１２．ＡＴＴＲのヒト化マウスモデルへのＬＮＰの送達
Ｖ３０Ｍ病原性突然変異体形態のヒトＴＴＲタンパク質を発現する遺伝性ＡＴＴＲアミロイドーシスのよく確立されたヒト化トランスジェニックマウスモデルをこの実施例において使用した。このマウスモデルは、末梢神経系および胃腸（ＧＩ）管などで、ＡＴＴＲ患者において観察される組織におけるＴＴＲ沈着表現型を再現する（Ｓａｎｔｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ　Ａｇｉｎｇ．　２０１０　Ｆｅｂ；３１（２）：２８０－９を参照）。
【０６０１】
マウス（約４～５か月齢）に、実施例１に記載されるようにクロスフローおよびＴＦＦ手順を使用して調製したＬＮＰ配合物を投与した。ＬＮＰは、６．０のＮ：Ｐ比を有するように配合され、５０：３８：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有した。ＬＮＰは、１：１のｇＲＮＡ：ｍＲＮＡの重量比で、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）およびＧ０００４８１（「Ｇ４８１」）または非標的化対照ガイドＧ０００３９５（「Ｇ３９５」；配列番号：２７３）のいずれかを含有した。
【０６０２】
マウスに実施例１に記載されるように側尾静脈を介してＬＮＰの単回の１ｍｇ／ｋｇ（全ＲＮＡ含有量のうち）の用量を注射した（ｎ＝１０／群）。処置の８週後にマウスを試料回収のために安楽死させた。Ｂｕｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍｙｌｏｉｄ．　２０１６　Ｊｕｎ；２３（２）：１０９－１８により以前に記載されたようにＥＬＩＳＡにより血清および脳脊髄液（ＣＳＦ）中のヒトＴＴＲタンパク質レベルを測定した。肝臓組織を実施例１に記載されるように編集レベルについてアッセイした。他の組織（胃、結腸、坐骨神経、後根神経節（ＤＲＧ））を回収し、Ｇｏｎｃａｌｖｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｍｙｌｏｉｄ．　２０１４　Ｓｅｐ；　２１（３）：　１７５－１８４により以前に記載

されたように半定量免疫組織化学のために処理した。免疫組織化学データについての統計解析はマン－ホイットニー検定を使用して行い、ｐ値＜０．０００１であった。

【０６０３】

図２３Ａ～Ｂに示すように、Ｇ４８１を含むＬＮＰの単回投与後のヒト化マウスの肝臓においてＴＴＲのロバストな編集（４９．４％）が観察され、対照群において編集は検出されなかった。編集事象の解析は、事象の９６．８％は挿入であり、残りは欠失であることを実証した。

【０６０４】

図２４Ａ～Ｂに示すように、ＴＴＲタンパク質レベルは、処置したマウスの血漿において減少したが、ＣＳＦにおいては減少せず、ＴＴＲ血漿レベルの９９％より高いノックダウンが観察された（ｐ＜０．００１）。

【０６０５】

処置した動物の血漿において観察されたＴＴＲの完全に近いノックダウンは、アッセイされた組織におけるＴＴＲタンパク質アミロイド沈着のクリアランスと相関した。図２５に示すように、対照マウスは、ＡＴＴＲを有するヒト対象において観察される病態生理学と似た組織におけるアミロイド染色を呈した。ＨｕＴＴＲ　Ｖ３０Ｍ遺伝子座の編集による循環性ＴＴＲの減少は、組織におけるアミロイド沈着の劇的な減少を結果としてもたらした。ＴＴＲ染色における約８５％またはより良好な低減が処置の８週後の処置された組織にわたり観察された（図２５）。

【０６０６】

実施例１３．初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるＴＴＲ　ｍＲＮＡのノックダウン

１つの実験において、実施例４に記載されるように、ＰＨＨを培養し、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号：１）および目的のｇＲＮＡを含むＬＮＰで処理した（図２９、表３４を参照）。上記したクロスフロー手順を使用してＬＮＰを調製し、ＰＤ－１０カラムおよびＡｍｉｃｏｎ遠心フィルターユニットを使用してそれぞれ精製および濃縮した。ＬＮＰは、６．０のＮ：Ｐ比を有するように配合され、５０：３８：９：２のモル比でリピドＡ、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ含有した。ＬＮＰは、１：２のｇＲＮＡ：ｍＲＮＡ比を含み、細胞を３００ｎｇの用量（送達されるｍＲＮＡカーゴの量に関して）で処理した。

【０６０７】

ＬＮＰ処理（各条件について生物学的三連を用いた）の９６時間後に、製造業者のプロトコールにしたがってＤｙｎａｂｅａｄｓ　ｍＲＮＡ　ＤＩＲＥＣＴ　Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＨＨ細胞からｍＲＮＡを精製した。逆転写（ＲＴ）をＭａｘｉｍａ逆転写酵素（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）およびポリ－ｄＴプライマーを用いて行った。結果として得られたｃＤＮＡをＡｍｐｕｒｅ　ＸＰ　Ｂｅａｄｓ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ）を用いて精製した。定量ＰＣＲのために、２％の精製されたｃＤＮＡをＴａｑｍａｎ　Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒｍｉｘならびに３つのＴａｑｍａｎプローブセット、ＴＴＲ（アッセイＩＤ：Ｈｓ００１７４９１４＿ｍ１）、ＧＡＰＤＨ（アッセイＩＤ：Ｈｓ０２７８６６２４＿ｇ１）、およびＰＰＩＢ（アッセイＩＤ：Ｈｓ００１６８７１９＿ｍ１）を用いて増幅した。アッセイは、製造業者の説明書（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にしたがってＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ　７　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍにより実行した。内因性対照（ＧＡＰＤＨおよびＰＰＩＢ）に対して個々に正規化することによりＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を算出した後、平均化した。

【０６０８】

図２９に示し、以下の表３４に数値を再現したように、試験した各ＬＮＰ配合物は、陰性（非処理）対照と比較して、ＴＴＲ　ｍＲＮＡのノックダウンを結果としてもたらした。図２９および表３４における群は、各ＬＮＰ調製物において使用されたｇＲＮＡ　ＩＤにより同定される。ＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を図２９にプロットした一方、ＴＴＲ　ｍＲＮＡのノックダウンパーセントを表３４に提供する。

【表３４】
表３４.

| ガイドID | ノックダウン%の平均 | 標準偏差 |
|---|---|---|
| G000480 | 95.19 | 1.68 |
| G000481 | 91.39 | 2.39 |
| G000482 | 82.31 | 4.51 |
| G000483 | 68.78 | 13.45 |
| G000484 | 75.22 | 9.05 |
| G000488 | 92.77 | 3.76 |
| G000489 | 91.85 | 2.77 |
| G000490 | 78.34 | 5.76 |
| G000493 | 87.53 | 4.54 |
| G000494 | 91.15 | 3.63 |
| G000499 | 91.38 | 1.71 |
| G000500 | 92.90 | 3.15 |
| G000567 | 90.89 | 5.39 |
| G000568 | 53.44 | 20.20 |
| G000570 | 93.38 | 2.66 |
| G000571 | 96.17 | 2.07 |
| G000572 | 55.92 | 24.53 |

【０６０９】
別々の実験において、Ｇ０００４８０、Ｇ０００４８６、およびＧ０００５０２を含むＬＮＰでの処理後にＴＴＲ　ｍＲＮＡノックダウンを評価した。細胞を１００ｎｇの用量（送達されるｍＲＮＡカーゴの量に関して）で処理したことを除いて、この実施例における上記の実験においてそれぞれ記載されるように、ＬＮＰを配合し、ＰＨＨを培養し、ＬＮＰで処理した。
【０６１０】
ＬＮＰ処理（各条件について単回の処理）の９６時間後に、製造業者のプロトコールにしたがってＤｙｎａｂｅａｄｓ　ｍＲＮＡ　ＤＩＲＥＣＴ　Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用してＰＨＨ細胞からｍＲＮＡを精製した。逆転写（ＲＴ）を製造業者の説明書にしたがってＨｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて行った。定量ＰＣＲのために、２％のｃＤＮＡをＴａｑｍａｎ　Ｆａｓｔ　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍａｓｔｅｒｍｉｘならびに３つのＴａｑｍａｎプローブセット、ＴＴＲ（アッセイＩＤ：Ｈｓ００１７４９１４＿ｍ１）、ＧＡＰＤＨ（アッセイＩＤ：Ｈｓ０２７８６６２４＿ｇ１）、およびＰＰＩＢ（アッセイＩＤ：Ｈｓ００１６８７１９＿ｍ１）を用いて増幅した。アッセイは、製造業者の説明書（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にしたがってＱｕａｎｔＳｔｕｄｉｏ　７　Ｆｌｅｘ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍにより実行した。内因性対照（ＧＡＰＤＨおよびＰＰＩＢ）に対して個々に正規化することによりＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を算出した後、平均化した。
【０６１１】
図３０に示し、以下の表３５に数値を再現したように、試験した各ＬＮＰ配合物は、陰性（非処理）対照と比較して、ＴＴＲ　ｍＲＮＡのノックダウンを結果としてもたらした。図３０および表３５における群は、各ＬＮＰ調製物において使用されたｇＲＮＡ　ＩＤにより同定される。ＴＴＲ　ｍＲＮＡの相対発現を図３０にプロットした一方、ＴＴＲ　ｍＲＮＡのノックダウンパーセントを表３５に提供する。

【表３５】

表３５.

| ガイドID | ノックダウン%の平均 | 標準偏差 |
|---|---|---|
| G000480 | 95.61 | 0.92 |
| G000486 | 97.36 | 0.63 |
| G000502 | 90.94 | 2.63 |

【０６１２】

配列表

以下の配列表は、本明細書において開示される配列のリストを提供する。ＤＮＡ配列（Ｔを含む）がＲＮＡに関して参照される場合、ＴはＵ（状況に応じて修飾または非修飾であってもよい）で置き換えられるべきであり、その反対も同様であることが理解される。

【０６１３】

【表３６－１】

| 説明 | 配列 | 配列番号 |
|---|---|---|
| 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 Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT<br>GGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA<br>GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGA<br>AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA<br>CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA<br>CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA<br>GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA<br>CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAG<br>CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT<br>CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG<br>CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT<br>CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC<br>GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG<br>ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT<br>GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA<br>GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA<br>CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC<br>ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT<br>GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA<br>AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG<br>AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT<br>GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG<br>AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG<br>AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAA<br>GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA<br>CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA<br>GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG<br>AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCT<br>GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC<br>AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA<br>GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT<br>CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT<br>GACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC<br>ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG<br>ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA<br>CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC<br>AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA<br>AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA | 1 |

【表３６－２】

| | | |
|---|---|---|
| | CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC<br>AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACA<br>GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT<br>GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA<br>CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA<br>CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT<br>CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG<br>AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT<br>CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC<br>ACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA<br>ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGAT<br>CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA<br>CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA<br>GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT<br>CAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA<br>CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT<br>CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT<br>CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT<br>CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT<br>CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA<br>GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG<br>AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA<br>CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA<br>GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG<br>AATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCT<br>GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC<br>GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG<br>CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT<br>CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA<br>AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA<br>CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA<br>CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCT<br>GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT<br>CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG<br>AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| ヒトにおいて一般に高い発現を有す | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGACGGGGA<br>TAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGC<br>AGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGG | 2 |

【表３６－３】

| | | |
|---|---|---|
| るコドンを使用する配列番号:205 に対応する Cas9 ORF を含む Cas9 転写物 | GAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTT<br>TGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCG<br>ACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTC<br>GAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATC<br>TTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAA<br>CATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCT<br>GCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTA<br>CTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGG<br>CGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAACTGGT<br>GCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGT<br>CGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGA<br>AAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAA<br>CTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGA<br>CCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGA<br>CTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCT<br>TGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGT<br>GAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTA<br>CGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCA<br>ACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTA<br>CGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCAT<br>CAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCT<br>GAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCAT<br>TCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGA<br>GGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCT<br>GACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCG<br>CTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTT<br>CGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGAAT<br>GACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAG<br>CCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATA<br>CGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAGAAGAA<br>AGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCA<br>GCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAAT<br>CAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCT<br>CCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGA<br>CATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGAT<br>GATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCAT<br>GAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAA<br>GCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTT<br>CCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGA<br>CGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCCGGACA<br>GGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGAT<br>TAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGT<br>CATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAA<br>CCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGAT<br>CGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGT<br>GGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAA<br>TGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGA<br>TTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGAT | |

10

20

30

40

【表３６－４】

| | | |
|---|---|---|
| | CGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAA<br>TGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCT<br>CCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGC<br>CGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCA<br>GCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTC<br>CCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAA<br>GGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCA<br>GTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATA<br>CCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGA<br>ATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGAT<br>AGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTA<br>CTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGA<br>AATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGT<br>GTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCC<br>GCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAA<br>GGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAA<br>AGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATA<br>CTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAA<br>ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGA<br>GAAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAA<br>GGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGG<br>TCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCT<br>GGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGA<br>AAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGA<br>GCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTC<br>AAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTA<br>CAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA<br>CTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGA<br>TACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGC<br>GACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCT<br>GTCGCAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCT<br>CAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCA<br>TCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACAT<br>AAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAA<br>ATGGAAAGAACCTCGAG | |
| 修飾sgRNA配列（「N」は任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよい） | mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 3 |

【表３６－５】

| | | |
|---|---|---|
| 30/30/39 ポリA配列 | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAACCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAA | 4 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003335 gRNA | CUGCUCCUCCUCUGCCUUGC | 5 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003336 gRNA | CCUCCUCUGCCUUGCUGGAC | 6 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003337 gRNA | CCAGUCCAGCAAGGCAGAGG | 7 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003338 gRNA | AUACCAGUCCAGCAAGGCAG | 8 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003339 gRNA | ACACAAAUACCAGUCCAGCA | 9 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003340 gRNA | UGGACUGGUAUUUGUGUCUG | 10 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR003341 gRNA | CUGGUAUUUGUGUCUGAGGC | 11 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003342 gRNA | CUUCUCUACACCCAGGGCAC | 12 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003343 gRNA | CAGAGGACACUUGGAUUCAC | 13 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003344 gRNA | UUUGACCAUCAGAGGACACU | 14 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003345 gRNA | UCUAGAACUUUGACCAUCAG | 15 |

【表３６－６】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003346 gRNA | AAAGUUCUAGAUGCUGUCCG | 16 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003347 gRNA | CAUUGAUGGCAGGACUGCCU | 17 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003348 gRNA | AGGCAGUCCUGCCAUCAAUG | 18 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003349 gRNA | UGCACGGCCACAUUGAUGGC | 19 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003350 gRNA | CACAUGCACGGCCACAUUGA | 20 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003351 gRNA | AGCCUUUCUGAACACAUGCA | 21 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003352 gRNA | GAAAGGCUGCUGAUGACACC | 22 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003353 gRNA | AAAGGCUGCUGAUGACACCU | 23 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003354 gRNA | ACCUGGGAGCCAUUUGCCUC | 24 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003355 gRNA | CCCAGAGGCAAAUGGCUCCC | 25 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003356 gRNA | GCAACUUACCCAGAGGCAAA | 26 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR003357 gRNA | UUCUUUGGCAACUUACCCAG | 27 |

【表３６－７】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003358 gRNA | AUGCAGCUCUCCAGACUCAC | 28 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003359 gRNA | AGUGAGUCUGGAGAGCUGCA | 29 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003360 gRNA | GUGAGUCUGGAGAGCUGCAU | 30 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003361 gRNA | GCUGCAUGGGCUCACAACUG | 31 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003362 gRNA | GCAUGGGCUCACAACUGAGG | 32 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003363 gRNA | ACUGAGGAGGAAUUUGUAGA | 33 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003364 gRNA | CUGAGGAGGAAUUUGUAGAA | 34 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003365 gRNA | UGUAGAAGGGAUAUACAAAG | 35 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003366 gRNA | AAAUAGACACCAAAUCUUAC | 36 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003367 gRNA | AGACACCAAAUCUUACUGGA | 37 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003368 gRNA | AAGUGCCUUCCAGUAAGAUU | 38 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003369 gRNA | CUCUGCAUGCUCAUGGAAUG | 39 |

【表３６－８】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003370 gRNA | CCUCUGCAUGCUCAUGGAAU | 40 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003371 gRNA | ACCUCUGCAUGCUCAUGGAA | 41 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR003372 gRNA | UACUCACCUCUGCAUGCUCA | 42 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003373 gRNA | GUAUUCACAGCCAACGACUC | 43 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003374 gRNA | GCGGCGGGGGCCGGAGUCGU | 44 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003375 gRNA | AAUGGUGUAGCGGCGGGGGC | 45 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003376 gRNA | CGGCAAUGGUGUAGCGGCGG | 46 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003377 gRNA | GCGGCAAUGGUGUAGCGGCG | 47 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003378 gRNA | GGCGGCAAUGGUGUAGCGGC | 48 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003379 gRNA | GGGCGGCAAUGGUGUAGCGG | 49 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003380 gRNA | GCAGGGCGGCAAUGGUGUAG | 50 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003381 gRNA | GGGGCUCAGCAGGGCGGCAA | 51 |

【表３６－９】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003382 gRNA | GGAGUAGGGGCUCAGCAGGG | 52 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003383 gRNA | AUAGGAGUAGGGGCUCAGCA | 53 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003384 gRNA | AAUAGGAGUAGGGGCUCAGC | 54 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003385 gRNA | CCCCUACUCCUAUUCCACCA | 55 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003386 gRNA | CCGUGGUGGAAUAGGAGUAG | 56 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003387 gRNA | GCCGUGGUGGAAUAGGAGUA | 57 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003388 gRNA | GACGACAGCCGUGGUGGAAU | 58 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003389 gRNA | AUUGGUGACGACAGCCGUGG | 59 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003390 gRNA | GGGAUUGGUGACGACAGCCG | 60 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003391 gRNA | GGCUGUCGUCACCAAUCCCA | 61 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR003392 gRNA | AGUCCCUCAUUCCUUGGGAU | 62 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR005298 gRNA | UCCACUCAUUCUUGGCAGGA | 63 |

【表３６－１０】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR005299 gRNA | AGCCGUGGUGGAAUAGGAGU | 64 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR005300 gRNA | UCACAGAAACACUCACCGUA | 65 |
| ヒトTTR(エクソン1)を標的化するCR005301 gRNA | GUCACAGAAACACUCACCGU | 66 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR005302 gRNA | ACGUGUCUUCUCUACACCCA | 67 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR005303 gRNA | UGAAUCCAAGUGUCCUCUGA | 68 |
| ヒトTTR(エクソン2)を標的化するCR005304 gRNA | GGCCGUGCAUGUGUUCAGAA | 69 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR005305 gRNA | UAUAGGAAAACCAGUGAGUC | 70 |
| ヒトTTR(エクソン3)を標的化するCR005306 gRNA | AAAUCUUACUGGAAGGCACU | 71 |
| ヒトTTR(エクソン4)を標的化するCR005307 gRNA | UGUCUGUCUUCUCUCAUAGG | 72 |
| カニクイザルTTRを標的化するCR000689 gRNA | ACACAAAUACCAGUCCAGCG | 73 |
| カニクイザルTTRを標的化するCR005364 gRNA | AAAGGCUGCUGAUGAGACCU | 74 |
| カニクイザルTTRを標的化するCR005365 gRNA | CAUUGACAGCAGGACUGCCU | 75 |

【表３６－１１】

| | | |
|---|---|---|
| カニクイザル TTR を標的化する CR005366 gRNA | AUACCAGUCCAGCGAGGCAG | 76 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005367 gRNA | CCAGUCCAGCGAGGCAGAGG | 77 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005368 gRNA | CCUCCUCUGCCUCGCUGGAC | 78 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005369 gRNA | AAAGUUCUAGAUGCCGUCCG | 79 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005370 gRNA | ACUUGUCUUCUCUAUACCCA | 80 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005371 gRNA | AAGUGACUUCCAGUAAGAUU | 81 |
| カニクイザル TTR を標的化する CR005372 gRNA | AAAAGGCUGCUGAUGAGACC | 82 |
| | 使用されない | 83 |
| | 使用されない | 84 |
| | 使用されない | 85 |
| | 使用されない | 86 |
| ヒト TTR を標的化する G000480 sgRNA 修飾配列 | mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGACACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 87 |
| ヒト TTR を標的化する G000481 sgRNA 修飾配列 | mU*mC*mU*AGAACUUUGACCAUCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 88 |
| ヒト TTR を標的化する G000482 sgRNA 修飾配列 | mU*mG*mU*AGAAGGGAUAUACAAAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 89 |
| ヒト TTR を標的化する G000483 sgRNA 修飾配列 | mU*mC*mC*ACUCAUUCUUGGCAGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 90 |

【表３６－１２】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTRを標的化するG000484 sgRNA修飾配列 | mA*mG*mA*CACCAAAUCUUACUGGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 91 |
| ヒトTTRを標的化するG000485 sgRNA修飾配列 | mC*mC*mU*CCUCUGCCUUGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 92 |
| ヒトTTRを標的化するG000486 sgRNA修飾配列 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 93 |
| ヒトTTRを標的化するG000487 sgRNA修飾配列 | mU*mU*mC*UUUGGCAACUUACCCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 94 |
| ヒトTTRを標的化するG000488 sgRNA修飾配列 | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCUGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 95 |
| ヒトTTRを標的化するG000489 sgRNA修飾配列 | mU*mU*mU*GACCAUCAGAGGACACUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 96 |
| ヒトTTRを標的化するG000490 sgRNA修飾配列 | mA*mA*mA*UAGACACCAAAUCUUACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 97 |
| ヒトTTRを標的化するG000491 sgRNA修飾配列 | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCAAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 98 |
| ヒトTTRを標的化するG000492 sgRNA修飾配列 | mC*mU*mU*CUCUACACCCAGGGCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 99 |
| ヒトTTRを標的化するG000493 sgRNA修飾配列 | mA*mA*mG*UGCCUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 100 |
| ヒトTTRを標的化するG000494 sgRNA修飾配列 | mG*mU*mG*AGUCUGGAGAGCUGCAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 101 |
| ヒトTTRを標的化するG000495 sgRNA修飾配列 | mC*mA*mG*AGGACACUUGGAUUCACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 102 |

【表３６－１３】

| | | |
|---|---|---|
| ヒトTTRを標的化するG000496 sgRNA修飾配列 | mG*mG*mC*CGUGCAUGUGUUCAGAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 103 |
| ヒトTTRを標的化するG000497 sgRNA修飾配列 | mC*mU*mG*CUCCUCCUCUGCCUUGCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 104 |
| ヒトTTRを標的化するG000498 sgRNA修飾配列 | mA*mG*mU*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 105 |
| ヒトTTRを標的化するG000499 sgRNA修飾配列 | mU*mG*mA*AUCCAAGUGUCCUCUGAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 106 |
| ヒトTTRを標的化するG000500 sgRNA修飾配列 | mC*mC*mA*GUCCAGCAAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 107 |
| ヒトTTRを標的化するG000501 sgRNA修飾配列 | mU*mC*mA*CAGAAACACUCACCGUAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 108 |
| ヒトTTRを標的化するG000567 sgRNA修飾配列 | mG*mA*mA*AGGCUGCUGAUGACACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 109 |
| ヒトTTRを標的化するG000568 sgRNA修飾配列 | mG*mG*mC*UGUCGUCACCAAUCCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 110 |
| ヒトTTRを標的化するG000570 sgRNA修飾配列 | mC*mA*mU*UGAUGGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 111 |
| ヒトTTRを標的化するG000571 sgRNA修飾配列 | mG*mU*mC*ACAGAAACACUCACCGUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 112 |
| ヒトTTRを標的化するG000572 sgRNA修飾配列 | mC*mC*mC*CUACUCCUAUUCCACCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 113 |
| カニクイザルTTRを標的化するG000502 sgRNA修飾配列 | mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 114 |

【表３６－１４】

| | | |
|---|---|---|
| カニクイザル TTR を標的化する G000503 sgRNA 修飾配列 | mA*mA*mA*AGGCUGCUGAUGAGACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 115 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000504 sgRNA 修飾配列 | mA*mA*mA*GGCUGCUGAUGAGACCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 116 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000505 sgRNA 修飾配列 | mC*mA*mU*UGACAGCAGGACUGCCUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 117 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000506 sgRNA 修飾配列 | mA*mU*mA*CCAGUCCAGCGAGGCAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 118 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000507 sgRNA 修飾配列 | mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAGAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 119 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000508 sgRNA 修飾配列 | mC*mC*mU*CCUCUGCCUCGCUGGACGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 120 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000509 sgRNA 修飾配列 | mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 121 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000510 sgRNA 修飾配列 | mA*mC*mU*UGUCUUCUCUAUACCCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 122 |
| カニクイザル TTR を標的化する G000511 sgRNA 修飾配列 | mA*mA*mG*UGACUUCCAGUAAGAUUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 123 |
| マウス TTR を標的化する G000282 sgRNA 修飾配列 | mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU | 124 |
| | 使用されない | 125 ～ 200 |
| 表 3 に列記される最少ウリジンコドンのチミジンアナログを使用 | ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGA TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTC CTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTG CTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCA AGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATC | 201 |

【表３６－１５】

| | | |
|---|---|---|
| し、開始コドンおよび終止コドンを有するCas9のDNAコーディング配列 | TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAA<br>GAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTC<br>GGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTAC<br>CACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG<br>ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATC<br>GAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAG<br>CTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC<br>GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTC<br>GGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC<br>TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC<br>GACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG<br>TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTG<br>AGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG<br>AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA<br>CAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAG<br>TTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTC<br>AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGA<br>AGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGA<br>CAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAG<br>ATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGG<br>AACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA<br>AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG<br>CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTC<br>AAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTC<br>AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTC<br>GAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC<br>GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGA<br>GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAG<br>GTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC<br>AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG<br>GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATC<br>CACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCG<br>GCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTC<br>AAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAG<br>AGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC<br>CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG<br>CAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTG<br>AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC<br>AGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA<br>CAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA | |

10 20 30 40

【表３６－１６】

| | | |
|---|---|---|
| | AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG<br>AGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTG<br>GACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAA<br>GTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGAC<br>TTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGAC<br>GCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAG<br>CTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG<br>ATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC<br>TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAC<br>GGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>ATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGC<br>ATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC<br>AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA<br>AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTC<br>GCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC<br>TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC<br>AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAC<br>GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC<br>TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTC<br>GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA<br>TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC<br>GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC<br>ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTAC<br>TTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTG<br>GACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC<br>GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGTCTAG | |
| ヒトにおいて一般に高い発現を有するコドンを使用するCas9のDNAコーディング配列 | ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGT<br>TGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTC<br>CTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTG<br>CTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCG<br>AGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATC<br>TTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAA<br>GAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTT<br>GGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTAC<br>CATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTG<br>ATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATC<br>GAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCAA<br>CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAGC<br>GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGC<br>CTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTC<br>GGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAAT<br>TTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC<br>GACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTG<br>TTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTG<br>CGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAG | 202 |

10 20 30 40

【表３６－１７】

| | | |
|---|---|---|
| | CGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGA<br>CAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAAT<br>GGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAG<br>TTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTC<br>AAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGA<br>TCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGC<br>CAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAA<br>ATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAAT<br>TCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGG<br>AATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAA<br>CGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAG<br>CACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG<br>AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACAG<br>AAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC<br>AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTG<br>GAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCAT<br>GATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAAC<br>GAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGC<br>GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAG<br>GTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCC<br>CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTG<br>GATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGATC<br>CACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTCC<br>GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCG<br>GCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTG<br>AAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGA<br>GAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAG<br>CGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCAC<br>CCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTG<br>CAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG<br>TCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC<br>TCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCA<br>GATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG<br>CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACT<br>AAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAA<br>CGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTG<br>GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAA<br>GTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGAC<br>TTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGAC<br>GCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAA<br>CTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAG<br>ATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC<br>TTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT<br>GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAA<br>ATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCT<br>ATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTT<br>TCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGC<br>AAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTC | |

10 20 30 40

【表３６－１８】

| | | |
|---|---|---|
| | GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAG<br>CTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCG<br>TTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTG<br>AAGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAA<br>AATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAAT<br>GAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCAC<br>TACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTC<br>GTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAG<br>TTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCG<br>GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATT<br>ATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTAC<br>TTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG<br>GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATC<br>GATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGAAGAGA<br>AAGGTGTAATGA | |
| C末端7アミノ酸として1つの核局在シグナル(1xNLS)を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKR<br>KV | 203 |
| 最少ウリジンコドンを使用し、開始コド | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG | 204 |

【表３６－１９】

| | | |
|---|---|---|
| ンおよび終止コドンを有するCas9 mRNA ORF | CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC | |

10 20 30 40

【表３６－２０】

| | | |
|---|---|---|
| | GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGUCUAG | |
| ヒトにおいて一般に高い発現を有するコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有するCas9 mRNA ORF | AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUCCGUGGGU<br>UGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUCUCAUCGGAGCCCUG<br>CUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCG<br>AGGCGACGCUACACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUC<br>UUUUCGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACCGCCUGGAA<br>GAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUU<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUAC<br>CAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCGACCUCAGAUUG<br>AUCUACUUGGCCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUUCCGCGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUCAA<br>CUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUGCUAGC<br>GGCGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGCGC<br>CUCGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUC<br>GGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAU<br>UUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAAGGACACCUACGAC | 205 |

【表３６－２１】

| | | |
|---|---|---|
| | GACGACUUGGACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUG<br>UUCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUG<br>CGCGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAG<br>CGGUACGACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCUCGUGAGA<br>CAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAU<br>GGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAG<br>UUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGA<br>UCCAUUCCCCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUUGCGGCGC<br>CAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAUCGAGAAA<br>AUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCCACUGGCGCGCGGCAAU<br>UCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGG<br>AAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAA<br>CGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAG<br>CACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUG<br>AAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAG<br>AAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUCAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUC<br>AAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGUUUCGACUCAGUG<br>GAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAU<br>GAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUUGACAACGAGGAGAAC<br>GAGGACAUCCUGGAAGAUAUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGC<br>GAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAG<br>GUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCGCCUCUCC<br>CGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUG<br>GAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAAGUGUCC<br>GGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCG<br>GCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUG<br>AAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGA<br>GAAAACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAG<br>CGGAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCAC<br>CCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUG<br>CAAAAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCGGUUG<br>UCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGAC<br>UCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCA<br>GAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUUACUGGCGG<br>CAGCUCCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACU<br>AAAGCCGAGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAAA<br>CGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUCUUG<br>GACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAA<br>GUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGAC<br>UUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGCGCAUGAC<br>GCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAA<br>CUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAG<br>AUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUACUUC<br>UUUUACUCAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUUACGCUGGCCAAU<br>GGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAA<br>AUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCU | |

10 20 30 40

【表３６－２２】

| | | |
|---|---|---|
| | AUGCCGCAAGUCAAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUU<br>UCAAAGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGC<br>AAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUC<br>GCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAG<br>CUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCG<br>UUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUG<br>AAGAAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAA<br>AAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAU<br>GAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAACUUCCUCUAUCUUGCUUCGCAC<br>UACGAAAAACUCAAAGGGUCACCGGAAGAUAACGAACAGAAGCAGCUUUUC<br>GUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAG<br>UUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGACAAAGUCCUGUCG<br>GCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUU<br>AUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAAGUAC<br>UUCGAUACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUG<br>GACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUC<br>GAUCUGUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGAAGAGA<br>AAGGUGUAAUGA | |
| Cas9 ニッカーゼ(D10A)アミノ酸配列 | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKR<br>KV | 206 |

【表３６－２３】

| | | |
|---|---|---|
| Cas9 ニッカーゼ(D10A)mRNA ORF | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG | 207 |

10

20

30

40

【表３６－２４】

| | | |
|---|---|---|
| | CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGUCUAG | |
| dCas9(D10A H840A)アミノ酸配列 | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS | 208 |

【表３６－２５】

| | | |
|---|---|---|
| | GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKR<br>KV | |
| dCas9(D10A<br>H840A)mRNA<br>ORF | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC | 209 |

【表３６－２６】

| | | |
|---|---|---|
| | AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC | |
| | GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC | |
| | GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC | |
| | GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA | |
| | GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG | |
| | GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC | |
| | AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG | |
| | GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC | |
| | CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC | |
| | GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG | |
| | GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC | |
| | AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA | |
| | GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG | |
| | AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC | |
| | CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG | |
| | CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG | |
| | AGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC | |
| | AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC | |
| | GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA | |
| | CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA | |
| | AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG | |
| | AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG | |
| | GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA | |
| | GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC | |
| | UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC | |
| | GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG | |
| | CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG | |
| | AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC | |
| | UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC | |
| | GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA | |
| | AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC | |
| | AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC | |
| | AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA | |
| | AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC | |
| | GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG | |
| | CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC | |
| | UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC | |
| | AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA | |
| | AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC | |
| | GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC | |
| | UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC | |
| | GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA | |
| | UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC | |
| | GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC | |
| | AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC | |
| | UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG | |
| | GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC | |

【表３６－２７】

| | | |
|---|---|---|
| | GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGUCUAG | |
| 最少ウリジンコドンを使用するCas9 mRNAコーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG<br>GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC<br>CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC<br>UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA<br>AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC<br>AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG<br>UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG<br>AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG<br>CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA<br>AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC<br>CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA<br>GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA<br>AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC<br>AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA<br>AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC<br>UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC<br>GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA<br>CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA<br>AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG<br>GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA<br>AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA | 210 |

10 20 30 40

【表３６－２８】

| | | |
|---|---|---|
| | AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG<br>GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG<br>AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC<br>GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC<br>AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC<br>AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG<br>CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA<br>CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC<br>AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC<br>CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA<br>UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG<br>GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG<br>AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC<br>UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA<br>GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC<br>GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG<br>CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC<br>AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG<br>AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG<br>GUC | |
| 最少ウリジンコドンを使用するCas9ニッカーゼコーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG | 211 |

【表３６－２９】

| | | |
|---|---|---|
| 含めるために好適） | GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG<br>GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC<br>CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC<br>UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA<br>AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC<br>AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG<br>UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG<br>AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG<br>CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA<br>AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC<br>CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA<br>GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA<br>AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC<br>AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA<br>AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC<br>UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC<br>GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA<br>CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA<br>AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG<br>GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA<br>AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA<br>AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG<br>GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG<br>AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC<br>GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC<br>AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC<br>AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG<br>CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA<br>CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC<br>AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC<br>CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA<br>UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG | |

【表３６－３０】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG<br>AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC<br>UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA<br>GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC<br>GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG<br>CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC<br>AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG<br>AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG<br>GUC | |
| 最少ウリジンコドンを使用するdCas9コーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG | 212 |

10 20 30 40

【表３６－３１】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC<br>CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC<br>UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA<br>AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC<br>AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG<br>UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG<br>AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG<br>CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA<br>AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC<br>CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA<br>GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA<br>AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC<br>AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA<br>AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC<br>UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC<br>GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA<br>CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA<br>AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG<br>GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA<br>AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA<br>AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG<br>GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG<br>AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC<br>GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC<br>AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC<br>AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG<br>CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA<br>CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC<br>AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC<br>CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA<br>UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG<br>GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG<br>AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC<br>UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA<br>GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC<br>GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG<br>CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC<br>AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG<br>AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC | |

10 20 30 40

【表３６－３２】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG<br>GUC | |
| Cas9 のアミノ酸配列(NLS なし) | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD | 213 |
| 最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有する配列番号:213 をコードする Cas9 mRNA ORF | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG | 214 |

【表３６－３３】

| | | |
|---|---|---|
| | CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC | |
| | GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA | |
| | CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC | |
| | GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC | |
| | UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC | |
| | GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG | |
| | UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG | |
| | AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG | |
| | AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA | |
| | CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC | |
| | GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG | |
| | UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC | |
| | AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA | |
| | AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA | |
| | CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG | |
| | AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC | |
| | AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG | |
| | AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA | |
| | AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG | |
| | CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC | |
| | AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG | |
| | AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC | |
| | AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC | |
| | GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC | |
| | GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC | |
| | GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA | |
| | GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG | |
| | GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC | |
| | AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG | |
| | GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC | |
| | CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC | |
| | GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG | |
| | GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC | |
| | AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA | |
| | GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG | |
| | AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC | |
| | CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG | |
| | CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG | |
| | AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC | |
| | AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC | |
| | GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA | |
| | CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA | |
| | AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG | |
| | AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG | |
| | GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA | |
| | GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC | |
| | UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC | |
| | GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG | |

【表３６－３４】

| | | |
|---|---|---|
| | CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG | |
| 最少ウリジンコドンを使用する配列番号:213 をコードする Cas9 コーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG | 215 |

【表３６－３５】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC | |
| | CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC | |
| | AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC | |
| | UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA | |
| | AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC | |
| | AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG | |
| | UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG | |
| | AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG | |
| | CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA | 10 |
| | AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC | |
| | CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA | |
| | GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA | |
| | AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC | |
| | AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA | |
| | AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC | |
| | UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC | |
| | GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA | |
| | CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA | |
| | AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG | 20 |
| | GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA | |
| | AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA | |
| | AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG | |
| | GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG | |
| | AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC | |
| | GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC | |
| | AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC | |
| | AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG | |
| | CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG | |
| | GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA | 30 |
| | CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC | |
| | AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC | |
| | AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC | |
| | CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA | |
| | UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG | |
| | GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG | |
| | AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC | |
| | UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA | |
| | GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC | |
| | GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG | 40 |
| | CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC | |
| | AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG | |
| | AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA | |
| | UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG | |
| | AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC | |
| | GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG | |
| | AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC | |
| | GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA | |
| | CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC | |

【表３６－３６】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC | |
| Cas9 ニッカーゼのアミノ酸配列(NLS なし) | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD | 216 |
| 表 3 に列記されるような最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有する配列番号:216 をコードする Cas9 ニ | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG | 217 |

【表３６－３７】

| | | |
|---|---|---|
| ッカーゼmRNA ORF | CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG | |

10 20 30 40

【表３６－３８】

| | | |
|---|---|---|
| | CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG | |
| 表３に列記されるような最少ウリジンコドンを使用する配列番号:216をコードするCas9ニッカーゼコーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG<br>GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC | 218 |

【表３６－３９】

| | | |
|---|---|---|
| | CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC<br>UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA<br>AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC<br>AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG<br>UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG<br>AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG<br>CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA<br>AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC<br>CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA<br>GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA<br>AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC<br>AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA<br>AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC<br>UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC<br>GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA<br>CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA<br>AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG<br>GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA<br>AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA<br>AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG<br>GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG<br>AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC<br>GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC<br>AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC<br>AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG<br>CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA<br>CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC<br>AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC<br>CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA<br>UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG<br>GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG<br>AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC<br>UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA<br>GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC<br>GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG<br>CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC<br>AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG<br>AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC | |

10

20

30

40

【表３６－４０】

| | | |
|---|---|---|
| | GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC | |
| dCas9 のアミノ酸配列(NLS なし) | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD | 219 |
| 表３に列記されるような最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有する配列番号:219 をコードする dCas9 mRNA ORF | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA | 220 |

【表３６－４１】

| | | |
|---|---|---|
| | CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC | |

【表３６－４２】

| | | |
|---|---|---|
| | UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACUAG | |
| 表３に列記されるような最少ウリジンコドンを使用する配列番号:219をコードするdCas9コーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG<br>GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC<br>CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC | 221 |

10 20 30 40

【表３６－４３】

| | | |
|---|---|---|
| | UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA | |
| | AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC | |
| | AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG | |
| | UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG | |
| | AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG | |
| | CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA | |
| | AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC | |
| | CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA | |
| | GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA | 10 |
| | AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC | |
| | AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA | |
| | AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC | |
| | UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC | |
| | GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA | |
| | CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA | |
| | AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG | |
| | GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA | |
| | AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA | |
| | AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG | 20 |
| | GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG | |
| | AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC | |
| | GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC | |
| | AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC | |
| | AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG | |
| | CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG | |
| | GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA | |
| | CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC | |
| | AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC | |
| | AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC | 30 |
| | CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA | |
| | UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG | |
| | GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG | |
| | AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC | |
| | UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA | |
| | GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC | |
| | GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG | |
| | CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC | |
| | AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG | |
| | AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA | 40 |
| | UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG | |
| | AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC | |
| | GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG | |
| | AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC | |
| | GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA | |
| | CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC | |
| | GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC | |
| | GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC | |
| | AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA | |

【表３６－４４】

| | | |
|---|---|---|
| | UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC | |
| C末端アミノ酸として2つの核局在シグナル(2xNLS)を有するCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKR<br>KVDGSPKKKRKVDSG | 222 |
| 最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有する配列番号:222をコードするCas9 mRNA ORF | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC | 223 |

【表３６－４５】

| | | |
|---|---|---|
| | GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC | |

【表３６－４６】

| | | |
|---|---|---|
| | GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC<br>GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG<br>AAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG | |
| 最少ウリジンコドンを使用する配列番号:222をコードするCas9コーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし;融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA<br>UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC<br>AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG<br>CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC<br>AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG | 224 |

【表３６－４７】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC<br>CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC<br>AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC<br>UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA<br>AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC<br>AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG<br>UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG<br>AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG<br>CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA<br>AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC<br>CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA<br>GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA<br>AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC<br>AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA<br>AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC<br>UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC<br>GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA<br>CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA<br>AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG<br>GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA<br>AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA<br>AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG<br>GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG<br>AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC<br>GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC<br>AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC<br>AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG<br>CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG<br>GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA<br>CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC<br>AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC<br>AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC<br>CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA<br>UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG<br>GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG<br>AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC<br>UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA<br>GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC<br>GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG<br>CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC<br>AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG<br>AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC | |

10 20 30 40

【表３６－４８】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG<br>GUCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUC<br>GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG<br>AAGAGAAAGGUCGACAGCGGA | 10 |
| C末端アミノ酸として2つの核局在シグナルを有するCas9ニッカーゼのアミノ酸配列 | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKR<br>KVDGSPKKKRKVDSG | 225 |
| 表3に列記されるような最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有す | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC<br>UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC | 226 |

【表３６－４９】

| | | |
|---|---|---|
| る配列番号:25をコードするCas9ニッカーゼmRNA ORF | GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG | |

10 20 30 40

【表３６－５０】

| | | |
|---|---|---|
| | GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG | |
| **最少ウリジンコドンを使用する配列番号:25 をコードする Cas9 ニッカーゼコーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適)** | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA<br>GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA<br>UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG<br>CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA | 227 |

【表３６－５１】

| | | |
|---|---|---|
| | UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC | |
| | AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG | |
| | CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC | |
| | AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG | |
| | GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC | |
| | CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC | |
| | AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC | |
| | UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA | |
| | AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC | 10 |
| | AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG | |
| | UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG | |
| | AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG | |
| | CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA | |
| | AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC | |
| | CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA | |
| | GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA | |
| | AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC | |
| | AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA | |
| | AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC | 20 |
| | UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC | |
| | GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA | |
| | CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA | |
| | AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG | |
| | GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA | |
| | AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA | |
| | AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG | |
| | GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG | |
| | AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC | |
| | GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC | 30 |
| | AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC | |
| | AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG | |
| | CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG | |
| | GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA | |
| | CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC | |
| | AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC | |
| | AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC | |
| | CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA | |
| | UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG | |
| | GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG | 40 |
| | AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC | |
| | UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA | |
| | GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC | |
| | GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG | |
| | CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC | |
| | AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG | |
| | AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA | |
| | UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG | |
| | AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC | |

【表３６－５２】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC<br>GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG<br>AAGAGAAAGGUCGACAGCGGA | |
| C末端アミノ酸として２つの核局在シグナルを有するdCas9のアミノ酸配列 | MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGAL<br>LFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLE<br>ESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRL<br>IYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINAS<br>GVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSN<br>FDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDIL<br>RVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKN<br>GYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNG<br>SIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGN<br>SRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPK<br>HSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTV<br>KQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEEN<br>EDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLS<br>RKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVS<br>GQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR<br>ENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL<br>QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS<br>DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIK<br>RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKD<br>FQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK<br>MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGE<br>IVWDKGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIAR<br>KKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSS<br>FEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGN<br>ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE<br>FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKY<br>FDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGSGSPKKKR<br>KVDGSPKKKRKVDSG | 228 |
| 最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有す | AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGA<br>UGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUC<br>CUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG<br>CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUC | 229 |

【表３６－５３】

| | | |
|---|---|---|
| る配列番号:228 をコードする dCas9 mRNA ORF | UUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAA<br>GAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUC<br>GGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC<br>CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUG<br>AUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUC<br>GAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAG<br>CUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGC<br>GGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC<br>GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAAC<br>UUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGAC<br>GACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUG<br>UUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUG<br>AGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAG<br>AGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGA<br>CAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAG<br>UUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC<br>AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGA<br>AGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGA<br>CAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG<br>AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGG<br>AACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAA<br>AGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAG<br>CACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUC<br>AAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUC<br>AAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUC<br>GAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC<br>GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAAC<br>GAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA<br>GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG<br>GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGC<br>AGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUG<br>GACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUC<br>CACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG<br>GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC<br>AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG<br>AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC<br>CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUG<br>CAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUG<br>AGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGAC<br>AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGA<br>CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACA | |

10 20 30 40

【表３６－５４】

| | | |
|---|---|---|
| | AAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAG<br>AGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUG<br>GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAA<br>GUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGAC<br>UUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGAC<br>GCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAG<br>CUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG<br>AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUC<br>UUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC<br>GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>AUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC<br>AUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC<br>AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGA<br>AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC<br>GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGC<br>UUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC<br>AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAC<br>GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCAC<br>UACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUC<br>GUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA<br>UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGC<br>GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUC<br>AUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC<br>UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUG<br>GACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC<br>GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC<br>GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAG<br>AAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG | |
| 最少ウリジンコドンを使用する配列番号:228 をコードする dCas9 コーディング配列(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGG<br>GCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUG<br>GGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG<br>UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGA<br>AGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUC<br>AGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAA<br>AGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGA<br>AACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCAC<br>CUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUC<br>UACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAA<br>GGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUG<br>GUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGA<br>GUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG<br>GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGA<br>AACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUC<br>GACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGAC<br>GACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUC<br>CUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGA | 230 |

【表３６－５５】

| | | |
|---|---|---|
| | GUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGA | |
| | UACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAG | |
| | CAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGA | |
| | UACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUC | |
| | AUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAG | |
| | CUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGC | |
| | AUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAG | |
| | GAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC | |
| | CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGC | |
| | AGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAAC | |
| | UUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA | |
| | AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCAC | |
| | AGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAG | |
| | UACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG | |
| | AAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAG | |
| | CAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA | |
| | AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGAC | |
| | CUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAA | |
| | GACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAA | |
| | AUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUC | |
| | AUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGA | |
| | AAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGAC | |
| | UUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCAC | |
| | GACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGA | |
| | CAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCA | |
| | AUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAG | |
| | GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAA | |
| | AACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAGAGA | |
| | AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCG | |
| | GUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAG | |
| | AACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC | |
| | GACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGC | |
| | AUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGAC | |
| | AACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAG | |
| | CUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAG | |
| | GCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGA | |
| | CAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC | |
| | AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUC | |
| | AAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUC | |
| | CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCA | |
| | UACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUG | |
| | GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUG | |
| | AUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUC | |
| | UACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA | |
| | GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUC | |
| | GUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUG | |
| | CCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGC | |
| | AAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAG | |

【表３６－５６】

| | | |
|---|---|---|
| | AAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCA<br>UACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG<br>AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUC<br>GAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAG<br>AAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAAC<br>GGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA<br>CUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUAC<br>GAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUC<br>GAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUC<br>AGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCA<br>UACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUC<br>CACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUC<br>GACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGAC<br>GCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGAC<br>CUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG<br>GUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA | |
| T7 プロモーター | TAATACGACTCACTATA | 231 |
| ヒトベータグロビン 5’ UTR | ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC | 232 |
| ヒトベータグロビン 3’ UTR | GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAG<br>TCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTC<br>TGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGC | 233 |
| ヒトアルファグロビン 5’ UTR | CATAAACCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGGTCCCCACAGACT<br>CAGAGAGAACCCACC | 234 |
| ヒトアルファグロビン 3’ UTR | GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCCTCCCCCCAGCCC<br>CTCCTCCCCTTCCTGCACCCGTACCCCCGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAG<br>TGGGCGGC | 235 |
| アフリカツメガエルベータグロビン 5’ UTR | AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC | 236 |
| アフリカツメガエルベータグロビン 3’ UTR | ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAATACCAACT<br>TACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCGTATCTGCTCC<br>TAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCT | 237 |
| ウシ成長ホルモン 5’ UTR | CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT | 238 |
| ウシ成長ホルモン 3’ UTR | TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGA<br>AGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA | 239 |
| ハツカネズミヘモグロビンアルファ、成体鎖 1(Hba-a1)、3’ UTR | GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTG<br>CACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAG | 240 |
| HSD17B4 5’ UTR | TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCA<br>GGCCTTATTC | 241 |

【表３６－５７】

| | | |
|---|---|---|
| マウス TTR 遺伝子を標的化する G282 シングルガイド RNA | mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 242 |
| | 使用されない | 243 |
| HSD の 5’ UTR、配列番号:204 に対応する ORF、および ALB の 3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACAT<br>CGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCC<br>GAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAA<br>GAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC<br>AAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT<br>CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAG<br>CTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCA<br>CGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGA<br>AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGA<br>CAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTT<br>CAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGT<br>CGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGA<br>AAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAG<br>ACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA<br>AAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGAC<br>ACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCT<br>GAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGG<br>AGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT<br>CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCT<br>GAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT<br>GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTT<br>CTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAG<br>CCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGG<br>AACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCA<br>GAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACT<br>GCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAA<br>CAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGG<br>ACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA<br>AGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAG<br>CGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAA<br>CGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTA<br>CAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGC<br>ATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC<br>AAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGAT<br>CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGC<br>AAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT<br>CCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACT<br>GACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC<br>ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACAC<br>AGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCA<br>GAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAG<br>AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACAT | 244 |

【表３６－５８】

| | | |
|---|---|---|
| | CCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGC<br>AAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAA<br>GGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAT<br>CGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAA<br>CAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAG<br>CCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAA<br>GCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGA<br>ACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCA<br>GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGA<br>CAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAA<br>GATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAG<br>AAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGA<br>CAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA<br>GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAA<br>CGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGT<br>CAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAA<br>CTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT<br>GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAA<br>GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAA<br>GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGAC<br>AGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAC<br>AAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAAC<br>AGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGA<br>AGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAG<br>CGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGG<br>ATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGA<br>AAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC<br>AATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGC<br>AAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTA<br>CAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG<br>AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTT<br>CCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAA<br>CGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT<br>CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAA<br>CCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAG<br>AGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGC<br>ACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACAC<br>AAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGG<br>ACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGG<br>AAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCAT<br>CTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATT<br>CATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC<br>ATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAA<br>AAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| 19.36%のＵ含量を有する代 | ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGT<br>TGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTC<br>CTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTG | 245 |

【表３６－５９】

| | | |
|---|---|---|
| 替的な Cas9 ORF | CTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCG<br>AGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATC<br>TTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAA<br>GAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTT<br>GGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTAC<br>CATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTG<br>ATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATC<br>GAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTGTTCATTCAA<br>CTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGC<br>GGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGC<br>CTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTC<br>GGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAAT<br>TTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC<br>GACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTG<br>TTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTG<br>CGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAG<br>CGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGA<br>CAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAAT<br>GGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAG<br>TTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTC<br>AAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACAGAGAACCTTTGACAACGGA<br>AGCATTCCACACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGC<br>CAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAA<br>ATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAAT<br>TCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGG<br>AATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAA<br>CGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAG<br>CACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTG<br>AAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTC<br>AAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTG<br>GAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCAT<br>GATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAAC<br>GAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGC<br>GAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAG<br>GTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCC<br>CGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTG<br>GATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGATC<br>CACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAGAAAGCACAAGTGAGC<br>GGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCG<br>GCGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTG<br>AAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCGA<br>GAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAG<br>CGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCAC<br>CCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTG<br>CAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTG<br>TCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC<br>TCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCA | |

10 20 30 40

【表３６－６０】

| | | |
|---|---|---|
| | GATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGG<br>CAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACT<br>AAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAA<br>CGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTG<br>GACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAA<br>GTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGAC<br>TTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGAC<br>GCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAA<br>CTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAG<br>ATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTC<br>TTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT<br>GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAA<br>ATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCT<br>ATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTT<br>TCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGC<br>AAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTC<br>GCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCG<br>TTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTG<br>AAGAAGGATCTGATCATCAAACTGCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAA<br>AATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAAT<br>GAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCAC<br>TACGAGAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTC<br>GTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAG<br>TTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCG<br>GCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATT<br>ATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTAC<br>TTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTG<br>GACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATC<br>GATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGAC<br>GTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAAGAAGAAACGGAAGGTG<br>TGATAG | |
| HSD の<br>5’ UTR、配列番号:245 に対応する ORF、Kozak 配列、および ALB の<br>3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACCATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCT<br>GGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAA<br>AGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGA<br>AGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAA<br>TCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGA<br>CGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAA<br>GAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTA<br>CCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTC<br>AACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGAT<br>CAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTC<br>CGACGTGGATAAGCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTT<br>CGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTC<br>CGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC | 246 |

【表３６－６１】

| | | |
|---|---|---|
| | GGGAGAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGG<br>ACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCT<br>GCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACA<br>AATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGA<br>CGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGC<br>GCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCT<br>CACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGA<br>GATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGG<br>CGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGAT<br>GGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCG<br>CAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGG<br>TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAA<br>GGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTA<br>CGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAA<br>ATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGG<br>AGCTTCGGCACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCT<br>CCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCAC<br>TGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAA<br>GCCGGCCTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTT<br>CAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATT<br>CAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCT<br>GACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGAC<br>CTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCG<br>GTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGA<br>TAAACAGAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGC<br>TAATCGTAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGA<br>GGACATCCAGAAAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACA<br>CATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAAC<br>TGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGA<br>GAATATCGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCA<br>GAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCT<br>GGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAA<br>CGAGAAGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGA<br>CCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGT<br>TCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCG<br>CAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGT<br>GAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTAC<br>CCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGA<br>GCTGGATAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGAT<br>TACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGA<br>CGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAA<br>ACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAAT<br>CAACAACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCAC<br>CGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGA<br>CTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAAT<br>CGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTCTT | |

10 20 30 40

【表３６－６２】

| | | |
|---|---|---|
| | CAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGAT<br>CGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTT<br>CGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAA<br>AACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAG<br>AAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTA<br>CGGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAA<br>GGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGG<br>GATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCT<br>GGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTGCC<br>CAAGTACTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTC<br>GGCCGGAGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGT<br>CAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCACCGGA<br>AGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGA<br>TGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGA<br>CGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCT<br>GGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAG<br>ATACACGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCAT<br>CACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATGG<br>TGGCGGTGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGG<br>TGGCCCCAAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAG<br>CATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTT<br>ATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAA<br>AACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAT<br>AAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| HSD の<br>5’ UTR、配列番号:245 に対応する ORF、および ALB の<br>3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCTATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATAT<br>CGGAACTAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCC<br>GTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAA<br>GAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGAC<br>CCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCAT<br>CTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTGGACGACAG<br>CTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCA<br>TGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGA<br>AAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGA<br>CAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATT<br>CCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGT<br>GGATAAGCTGTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGA<br>AAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCG<br>GCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA<br>GAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCAC<br>TCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACT<br>CTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGG<br>CGATCAGTACGCGGATCTGTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAAT<br>CTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCT<br>TAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCT<br>GCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATTTT | 247 |

【表３６－６３】

| | | |
|---|---|---|
| | CTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCCAG<br>CCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGG<br>AACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAAACA<br>GAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGATCCATCTGGGTGAGCT<br>GCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAA<br>CCGGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGG<br>CCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGA<br>GGAAACCATCACTCCTTGGAATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTC<br>GGCACAATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAA<br>CGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTA<br>CAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGC<br>CTTTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTCGATCTGCTGTTCAAGAC<br>CAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGAT<br>CGAGTGTTTCGACTCAGTGGAAATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGC<br>TTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTT<br>CCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTT<br>GACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGC<br>TCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACAC<br>TGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACA<br>GAGCGGTAAAACTATCCTGGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCG<br>TAACTTCATGCAGTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACAT<br>CCAGAAAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC<br>GAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATCCTGCAAACTGTGAA<br>GGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATAT<br>CGTGATTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAGAA<br>CTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAG<br>CCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAA<br>GCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGA<br>GCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACA<br>GTCCTTTCTGAAGGATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGA<br>CAAGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAA<br>GATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAG<br>AAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGA<br>TAAGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAA<br>GCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAA<br>CGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGT<br>GTCGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAA<br>CTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGCACCGCCCT<br>GATCAAGAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAA<br>GGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA<br>AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTCTTCAAGAC<br>TGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAAC<br>TAACGGAGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAAC<br>TGTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGA<br>AGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAG<br>CGACAAGCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGG<br>ATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGA<br>GAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTAC | |

【表３６－６４】

| | | |
|---|---|---|
| | CATCATGGAACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTGGAGGC<br>GAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACTGCCCAAGTA<br>CTCACTGTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGG<br>AGAACTCCAGAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTT<br>CCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAA<br>CGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAAT<br>CATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAA<br>CCTCGACAAAGTCCTGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAG<br>AGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGC<br>TCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACAC<br>GTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGG<br>ACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGG<br>TGGATCCTACCCATACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCC<br>CAAGAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC<br>AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCAT<br>CTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATA<br>AATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAA<br>TGGAAAGAACCTCGAG | |
| | 使用されない | 248 |
| ヒトにおいて一般に高い発現を有するコドンを使用するCas9 ORFを有するKozak配列を含むCas9転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTCGA<br>CGGGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGG<br>TTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGT<br>CCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCT<br>GCTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGC<br>GAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGAT<br>CTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGA<br>AGAATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTT<br>TGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTA<br>CCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATT<br>GATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGAT<br>CGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCA<br>ACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAGAAAACCCAATCAATGCTAG<br>CGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCG<br>CCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTT<br>CGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAA<br>TTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGA<br>CGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCT<br>GTTCCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCT<br>GCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAA<br>GCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAG<br>ACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAA<br>TGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAA<br>GTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGT<br>CAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGG<br>ATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCG<br>CCAGGAGGACTTTTACCCATTCCTCAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAA | 249 |

【表３６－６５】

| | | |
|---|---|---|
| | AATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAA<br>TTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTG<br>GAATTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGA<br>ACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAA<br>GCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGT<br>GAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAACA<br>GAAGAAAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGT<br>CAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGT<br>GGAAATCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCA<br>TGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAA<br>CGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCG<br>CGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAA<br>GGTCATGAAACAACTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTC<br>CCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACTATCCT<br>GGATTTCCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAATTGAT<br>CCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTC<br>CGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCC<br>GGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGT<br>GAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCG<br>AGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAA<br>GCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCA<br>CCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATTT<br>GCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTT<br>GTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGA<br>CTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTC<br>AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCG<br>GCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCAC<br>TAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA<br>ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTT<br>GGACTCCCGCATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGA<br>AGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGA<br>CTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACTACCATCACGCGCATGA<br>CGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAA<br>ACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAA<br>GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTT<br>CTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAA<br>TGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGA<br>AATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTCGCAAAGTGCTCTC<br>TATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATT<br>TTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACG<br>CAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTCGCCGACTGT<br>CGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAA<br>GCTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTC<br>GTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGT<br>GAAGAAGGATCTGATCATCAAACTCCCCAAGTACTCACTGTTCGAACTGGA<br>AAATGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAA<br>TGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCA<br>CTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTT | |

【表３６－６６】

| | | |
|---|---|---|
| | CGTGGAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGA<br>GTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCCTGTC<br>GGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACAT<br>TATCCACTTGTTCACCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTTCAAGTA<br>CTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGTTCT<br>GGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGAT<br>CGATCTGTCGCAGCTGGGTGGCGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAA<br>GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCT<br>TATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAA<br>AAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAA<br>TAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| スプライスジャンクションが除去されたCas9 ORF；12.75%のU含量 | ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGA<br>TGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTC<br>CTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTG<br>CTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCA<br>AGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATC<br>TTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAA<br>GAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTC<br>GGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTAC<br>CACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG<br>ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATC<br>GAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAG<br>CTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC<br>GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTC<br>GGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC<br>TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGAC<br>GACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTG<br>TTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTG<br>AGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG<br>AGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGA<br>CAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAG<br>TTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTC<br>AAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGA<br>AGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGA<br>CAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAG<br>ATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAC<br>AGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGG<br>AACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAA<br>AGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG<br>CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTC<br>AAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAG<br>AAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTC<br>AAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTC<br>GAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCAC<br>GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAAC | 250 |

【表３６－６７】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGA<br>GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAG<br>GTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGC<br>AGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTG<br>GACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATC<br>CACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGC<br>GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCG<br>GCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTC<br>AAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA<br>GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAG<br>AGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC<br>CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTG<br>CAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTG<br>AGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC<br>AGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC<br>GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA<br>CAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA<br>AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAG<br>AGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTG<br>GACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAA<br>GTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGAC<br>TTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGAC<br>GCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAG<br>CTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAG<br>ATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTC<br>TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAAC<br>GGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAA<br>ATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGC<br>ATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTC<br>AGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGA<br>AAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTC<br>GCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAG<br>CTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGC<br>TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC<br>AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAA<br>AACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAAC<br>GAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCAC<br>TACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTC<br>GTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAA<br>TTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGC<br>GCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATC<br>ATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTAC<br>TTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTG<br>GACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC<br>GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGA<br>AAGGTCTAG | |

10 20 30 40

【表３６－６８】

| | | |
|---|---|---|
| HSD の 5’ UTR、配列番号:250 に対応する ORF、Kozak 配列、および ALB の 3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT<br>GGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA<br>GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGA<br>AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA<br>CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA<br>CGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA<br>GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA<br>CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAG<br>CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT<br>CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG<br>CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT<br>CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC<br>GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG<br>ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT<br>GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA<br>GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA<br>CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC<br>ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT<br>GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA<br>AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG<br>AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT<br>GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG<br>AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG<br>AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAA<br>GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA<br>CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA<br>GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG<br>AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCT<br>GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC<br>AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA<br>GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT<br>CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT<br>GACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC<br>ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG<br>ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA<br>CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC<br>AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA<br>AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA<br>CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC<br>AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACA<br>GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT | 251 |

【表３６－６９】

| | | |
|---|---|---|
| | GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA<br>CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGA<br>CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT<br>CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG<br>AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT<br>CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC<br>ACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA<br>ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGAT<br>CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA<br>CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA<br>GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT<br>CAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA<br>CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT<br>CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT<br>CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT<br>CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT<br>CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA<br>GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG<br>AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA<br>CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA<br>GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG<br>AATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCT<br>GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC<br>GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG<br>CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT<br>CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA<br>AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA<br>CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA<br>CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCT<br>GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT<br>CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG<br>AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| 一般にヒトにおいて頻繁に使用される最少ウリジンコドンを有するCas9 ORF；12.75%のU含量 | ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGC<br>TGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTG<br>CTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTG<br>CTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCC<br>AGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATC<br>TTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAG<br>GAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTC<br>GGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTAC | 252 |

【表３６－７０】

| | | |
|---|---|---|
| | CACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTG<br>ATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATC<br>GAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAG<br>CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGC<br>GGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGA<br>CTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTC<br>GGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAAC<br>TTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGAC<br>GACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTG<br>TTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTG<br>AGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAG<br>AGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGA<br>CAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC<br>GGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAG<br>TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTG<br>AAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGC<br>AGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGA<br>CAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAG<br>ATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAAC<br>AGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGG<br>AACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAG<br>AGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG<br>CACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTG<br>AAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAG<br>AAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTG<br>AAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTG<br>GAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTACCAC<br>GACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAAC<br>GAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGA<br>GAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAG<br>GTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGC<br>AGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTG<br>GACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGCTGATC<br>CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGC<br>GGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCC<br>GCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTG<br>AAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGA<br>GAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAG<br>AGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCAC<br>CCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG<br>CAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTG<br>AGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC<br>AGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGC<br>GACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGA<br>CAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACC<br>AAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG<br>AGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTG<br>GACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAG | |

10 20 30 40

【表３６－７１】

| | | |
|---|---|---|
| | GTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGAC<br>TTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGAC<br>GCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAG<br>CTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAG<br>ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTC<br>TTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAAC<br>GGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAG<br>ATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGC<br>ATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTC<br>AGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGA<br>AAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTG<br>GCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAG<br>CTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGC<br>TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTG<br>AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAG<br>AACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAAC<br>GAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCAC<br>TACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTC<br>GTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAG<br>TTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGC<br>GCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATC<br>ATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTAC<br>TTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTG<br>GACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATC<br>GACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGA<br>AAGGTGTGA | |
| HSD の<br>5’ UTR、配列番号:252 に対応する ORF、Kozak 配列、および ALB の<br>3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCT<br>GGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA<br>GGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGA<br>GGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAA<br>CAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGA<br>CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAA<br>GAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTA<br>CCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAG<br>CACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGAT<br>CAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG<br>CGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT<br>CGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAG<br>CGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCC<br>CGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGG<br>CCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCT<br>GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCA<br>GATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGA<br>CGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGC<br>CCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCT | 253 |

【表３６－７２】

| | | |
|---|---|---|
| | GACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGA<br>GATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGG<br>CGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGAT<br>GGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAG<br>AAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGG<br>CGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAA<br>GGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTA<br>CGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAA<br>GAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGG<br>CGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCT<br>GCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCAC<br>CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAA<br>GCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTT<br>CAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATT<br>CAACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT<br>GACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGAC<br>CTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG<br>ATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGA<br>CAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGC<br>CAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGA<br>GGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA<br>CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGAC<br>CGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGA<br>GAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCA<br>GAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCT<br>GGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAA<br>CGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGA<br>CCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGT<br>GCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAG<br>AAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGT<br>GAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAC<br>CCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGA<br>GCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGAT<br>CACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGA<br>CGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGCAA<br>GCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGAT<br>CAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAC<br>CGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGA<br>CTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGAT<br>CGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT<br>CAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGAT<br>CGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTT<br>CGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAA<br>GACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAG<br>AAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTA<br>CGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAA | |

10 20 30 40

【表３６－７３】

| | | |
|---|---|---|
| | GGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGG<br>CATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCT<br>GGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC<br>CAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAG<br>CGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGT<br>GAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGA<br>GGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGA<br>CGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGA<br>CGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCC<br>CATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCT<br>GGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAG<br>ATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCAT<br>CACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGG<br>CGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| 一般にヒトにおいて頻繁に使用されない最少ウリジンコドンを有するCas9 ORF；12.75%のU含量 | ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGAACAGCGTAGGG<br>TGGGCGGTAATAACGGACGAATACAAAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTA<br>CTAGGGAACACGGACCGACACAGCATAAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTA<br>CTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTAAAACGAACGGCG<br>CGACGACGATACACGCGACGAAAAAACCGAATATGCTACCTACAAGAAATA<br>TTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAA<br>GAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGACACCCGATATTC<br>GGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTACCACGAAAAATACCCGACGATATAC<br>CACCTACGAAAAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTACGACTA<br>ATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATTCCGAGGGCACTTCCTAATA<br>GAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAGCGACGTAGACAAACTATTCATACAA<br>CTAGTACAAACGTACAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGC<br>GGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGA<br>CTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACCGGGGGAAAAAAAAAAACGGGCTATTC<br>GGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACTTCAAAAGCAAC<br>TTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACTAAGCAAAGACACGTACGAC<br>GACGACCTAGACAACCTACTAGCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTA<br>TTCCTAGCGGCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACTA<br>CGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGCGCCGCTAAGCGCGAGCATGATAAAA<br>CGATACGACGAACACCACCAAGACCTAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGA<br>CAACAACTACCGGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAAAC<br>GGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAA<br>TTCATAAAACCGATACTAGAAAAAATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTA<br>AAACTAAACCGAGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTCGACAACGGG<br>AGCATACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACACGCGATACTACGACGA<br>CAAGAAGACTTCTACCCGTTCCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAA<br>ATACTAACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGGAAC<br>AGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGG<br>AACTTCGAAGAAGTAGTAGACAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAA | 254 |

【表３６－７４】

| | | |
|---|---|---|
| | CGAATGACGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACCGAAA | |
| | CACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATACAACGAACTAACGAAAGTA | |
| | AAATACGTAACGGAAGGGATGCGAAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAA | |
| | AAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATTCAAAACGAACCGAAAAGTAACGGTA | |
| | AAACAACTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTA | |
| | GAAATAAGCGGGGTAGAAGACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCAC | |
| | GACCTACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACGAAGAAAAC | |
| | GAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAACGCTATTCGAAGACCGA | |
| | GAAATGATAGAAGAACGACTAAAAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAA | 10 |
| | GTAATGAAACAACTAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGGCGACTAAGC | |
| | CGAAAACTAATAAACGGGATACGAGACAAACAAAGCGGGAAAACGATACTA | |
| | GACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCGCGAACCGAAACTTCATGCAACTAATA | |
| | CACGACGACAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGC | |
| | GGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCG | |
| | GCGATAAAAAAAGGGATACTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTA | |
| | AAAGTAATGGGGCGACACAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATGGCGCGA | |
| | GAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAA | |
| | CGAATAGAAGAAGGGATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACAC | |
| | CCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAAACTATACCTATACTACCTA | 20 |
| | CAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCAAGAACTAGACATAAACCGACTA | |
| | AGCGACTACGACGTAGACCACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGAC | |
| | AGCATAGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCGAGGGAAAAGC | |
| | GACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAAAAAAAATGAAAAACTACTGGCGA | |
| | CAACTACTAAACGCGAAACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAACG | |
| | AAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCGGGGTTCATAAAA | |
| | CGACAACTAGTAGAAACGCGACAAATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTA | |
| | GACAGCCGAATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAAACTAATACGAGAA | |
| | GTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGAC | |
| | TTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAATAAACAACTACCACCACGCGCACGAC | 30 |
| | GCGTACCTAAACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAA | |
| | CTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAGTATACGACGTACGAAAA | |
| | ATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTC | |
| | TTCTACAGCAACATAATGAACTTCTTCAAAACGGAAATAACGCTAGCGAAC | |
| | GGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACGGGGAAACGGGGGAA | |
| | ATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGC | |
| | ATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGGGGGTTC | |
| | AGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGACAAACTAATAGCGCGA | |
| | AAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATACGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTA | |
| | GCGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAAA | |
| | CTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGATAACGATAATGGAACGAAGCAGC | 40 |
| | TTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCCTAGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTA | |
| | AAAAAAGACCTAATAATAAAACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACTAGAA | |
| | AACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGGGAACTACAAAAAGGGAAC | |
| | GAACTAGCGCTACCGAGCAAATACGTAAACTTCCTATACCTAGCGAGCCAC | |
| | TACGAAAAACTAAAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAACTATTC | |
| | GTAGAACAACACAAACACTACCTAGACGAAATAATAGAACAAATAAGCGAA | |
| | TTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGC | |
| | GCGTACAACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGAAAACATA | |

【表３６－７５】

| | | |
|---|---|---|
| | ATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGCGCCGGCGGCGTTCAAATAC<br>TTCGACACGACGATAGACCGAAAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTA<br>GACGCGACGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAACGCGAATA<br>GACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGGGGGGGGGAGCCCGAAAAAAAAACGA<br>AAAGTATGA | |
| HSD の<br>5’ UTR、配列番号:254 に対応する ORF、Kozak 配列、および ALB の<br>3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCT<br>AGACATAGGGACGAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACAA<br>AGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGACCGACACAGCAT<br>AAAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGA<br>AGCGACGCGACTAAAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAAAA<br>CCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAAATGGCGAAAGTAGA<br>CGACAGCTTCTTCCACCGACTAGAAGAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAA<br>AAAACACGAACGACACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTA<br>CCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAAAAAACTAGTAGACAG<br>CACGGACAAAGCGGACCTACGACTAATATACCTAGCGCTAGCGCACATGAT<br>AAAATTCCGAGGGCACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAG<br>CGACGTAGACAAACTATTCATACAACTAGTACAAACGTACAACCAACTATT<br>CGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAG<br>CGCGCGACTAAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACC<br>GGGGGAAAAAAAAAAACGGGCTATTCGGGAACCTAATAGCGCTAAGCCTAGG<br>GCTAACGCCGAACTTCAAAAGCAACTTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACT<br>ACAACTAAGCAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTAGCGCA<br>AATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCGAAAAACCTAAGCGA<br>CGCGATACTACTAAGCGACATACTACGAGTAAACACGGAAATAACGAAAGC<br>GCCGCTAAGCGCGAGCATGATAAAACGATACGACGAACACCACCAAGACCT<br>AACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACTACCGGAAAAATACAAAGA<br>AATATTCTTCGACCAAAGCAAAAACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGG<br>GGCGAGCCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAAAAT<br>GGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAAACTAAACCGAGAAGACCTACTACG<br>AAAACAACGAACGTTCGACAACGGGAGCATACCGCACCAAATACACCTAGG<br>GGAACTACACGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCCTAAA<br>AGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAAATACTAACGTTCCGAATACCGTACTA<br>CGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGGAACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAA<br>AAGCGAAGAAACGATAACGCCGTGGAACTTCGAAGAAGTAGTAGACAAAGG<br>GGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGACGAACTTCGACAAAAACCT<br>ACCGAACGAAAAAGTACTACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCAC<br>GGTATACAACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGATGCGAAA<br>ACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAAAAAAAAGCGATAGTAGACCTACTATT<br>CAAAACGAACCGAAAAGTAACGGTAAAACAACTAAAAGAAGACTACTTCAA<br>AAAAATAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAGACCGATT<br>CAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTAAAAATAATAAAAGACAA<br>AGACTTCCTAGACAACGAAGAAAACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACT<br>AACGCTAACGCTATTCGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTAAAAAC<br>GTACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAATGAAACAACTAAAACGACGACG<br>ATACACGGGGTGGGGGCGACTAAGCCGAAAACTAATAAACGGGATACGAGA<br>CAAACAAAGCGGGAAAACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGACGGGTTCGC | 255 |

【表３６－７６】

| | | |
|---|---|---|
| | GAACCGAAACTTCATGCAACTAATACACGACGACAGCCTAACGTTCAAAGA<br>AGACATACAAAAAGCGCAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACA<br>CATAGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGGCGATAAAAAAAGGGATACTACAAAC<br>GGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAATGGGGCGACACAAACCGGA<br>AAACATAGTAATAGAAATGGCGCGAGAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCA<br>AAAAAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGATAAAAGAACT<br>AGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAA<br>CGAAAAACTATACCTATACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGA<br>CCAAGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAGACCACATAGT<br>ACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGCATAGACAACAAAGTACTAACGCG<br>AAGCGACAAAAACCGAGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGT<br>AAAAAAAATGAAAAACTACTGGCGACAACTACTAAACGCGAAACTAATAAC<br>GCAACGAAAATTCGACAACCTAACGAAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGA<br>ACTAGACAAAGCGGGGTTCATAAAACGACAACTAGTAGAAACGCGACAAAT<br>AACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGAACACGAAATACGA<br>CGAAAACGACAAACTAATACGAGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAA<br>ACTAGTAAGCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAAT<br>AAACAACTACCACCACGCGCACGACGCGTACCTAAACGCGGTAGTAGGGAC<br>GGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAACTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGA<br>CTACAAAGTATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAAT<br>AGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGCAACATAATGAACTTCTT<br>CAAAACGGAAATAACGCTAGCGAACGGGGAAATACGAAAACGACCGCTAAT<br>AGAAACGAACGGGGAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGACTT<br>CGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAGTAAACATAGTAAAAAA<br>AACGGAAGTACAAACGGGGGGGTTCAGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACG<br>AAACAGCGACAAACTAATAGCGCGAAAAAAAGACTGGGACCCGAAAAAATA<br>CGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGCGTACTAGTAGTAGCGAA<br>AGTAGAAAAAGGGAAAAGCAAAAAACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGG<br>GATAACGATAATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAAACCCGATAGACTTCCT<br>AGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAAGACCTAATAATAAAACTACC<br>GAAATACAGCCTATTCGAACTAGAAAACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAG<br>CGCGGGGGAACTACAAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGCAAATACGT<br>AAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAAACTAAAAGGGAGCCCGGA<br>AGACAACGAACAAAAACAACTATTCGTAGAACAACACAAACACTACCTAGA<br>CGAAATAATAGAACAAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATACTAGCGGA<br>CGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTACAACAAACACCGAGACAAACC<br>GATACGAGAACAAGCGGAAAACATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCT<br>AGGGGCGCCGGCGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACCGAAAACG<br>ATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCGACGCTAATACACCAAAGCAT<br>AACGGGGCTATACGAAACGCGAATAGACCTAAGCCAACTAGGGGGGGACGG<br>GGGGGGGAGCCCGAAAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| CleanCap(商標)と共に使用 | AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT | 256 |

【表３６－７７】

| | | |
|---|---|---|
| するための最初の3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Cas9転写物 | GGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA<br>GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGA<br>AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA<br>CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA<br>CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA<br>GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA<br>CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAG<br>CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT<br>CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG<br>CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT<br>CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC<br>GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG<br>ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT<br>GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA<br>GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA<br>CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC<br>ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT<br>GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA<br>AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG<br>AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT<br>GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG<br>AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG<br>AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAA<br>GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA<br>CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA<br>GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG<br>AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCT<br>GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC<br>AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA<br>GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT<br>CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT<br>GACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC<br>ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG<br>ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA<br>CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC<br>AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA<br>AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA<br>CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC<br>AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACA<br>GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT<br>GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA<br>CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA | |

【表３６－７８】

| | | |
|---|---|---|
| | CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT<br>CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG<br>AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT<br>CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC<br>ACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA<br>ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGAT<br>CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA<br>CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA<br>GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT<br>CAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA<br>CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT<br>CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT<br>CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT<br>CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT<br>CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA<br>GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG<br>AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA<br>CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA<br>GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG<br>AATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCT<br>GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC<br>GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG<br>CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT<br>CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA<br>AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA<br>CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA<br>CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCT<br>GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT<br>CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG<br>AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| CMV からの 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 Cas9 転写物 | GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA<br>CACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGG<br>ATTCCCCGTGCCAAGAGTGACTCACCGTCCTTGACACGGCCACCATGGACA<br>AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAG<br>TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA<br>ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG<br>ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA<br>GATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA<br>ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT<br>TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA | 257 |

【表３６－７９】

| | | |
|---|---|---|
| | TCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA<br>GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC<br>TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG<br>ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCC<br>AGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG<br>ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA<br>ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACC<br>TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC<br>TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC<br>TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGG<br>CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA<br>ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG<br>ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC<br>TGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG<br>CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCA<br>AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA<br>ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCC<br>CGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG<br>ACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA<br>CATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT<br>TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG<br>AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA<br>CAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCC<br>TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG<br>TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG<br>CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC<br>TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA<br>GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC<br>TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACA<br>TCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGA<br>TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGA<br>AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC<br>TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC<br>TGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG<br>ACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG<br>GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA<br>AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA<br>TGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC<br>AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCG<br>AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG<br>AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG<br>GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT<br>ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG<br>ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACG<br>TCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC<br>TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG<br>AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC<br>TGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA | |

10 20 30 40

【表３６－８０】

| | | |
|---|---|---|
| | GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG<br>TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC<br>TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA<br>GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCG<br>CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA<br>GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA<br>TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCT<br>GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC<br>AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG<br>AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG<br>ACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA<br>GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA<br>GCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAA<br>AGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG<br>ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA<br>GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG<br>CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA<br>AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAAC<br>AGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA<br>AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA<br>ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC<br>TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA<br>CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA<br>CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA<br>GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCT<br>AGCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAA<br>AGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGT<br>AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTC<br>TTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| HBB からの 5’ UTR、配列番号:204 に対応する ORF、Kozak 配列、および HBB の 3’ UTR を有する Cas9 転写物 | GGGACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACA<br>CCGGATCTGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAA<br>CAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCA<br>AGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACC<br>TGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC<br>TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCT<br>ACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCT<br>TCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA<br>GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGT<br>ACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGG<br>CAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAG<br>GACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACA<br>AGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACC<br>CGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGA<br>GCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGA<br>AGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGA<br>ACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA | 258 |

【表３６－８１】

| | | |
|---|---|---|
| | AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACC<br>AGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC<br>TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCG<br>CAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGA<br>AGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCG<br>ACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGG<br>AAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAG<br>AAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAA<br>CATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACG<br>CAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAG<br>AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGC<br>TGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAA<br>CAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCAC<br>AGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAA<br>AGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACG<br>AACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCC<br>TGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACA<br>GAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAAT<br>GCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC<br>TGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG<br>ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACAC<br>TGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACC<br>TGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGAT<br>GGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCG<br>GAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACT<br>TCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGA<br>AGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACC<br>TGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCG<br>TCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCA<br>TCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA<br>GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGA<br>TCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGT<br>ACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGG<br>ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCT<br>TCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGA<br>ACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGA<br>AGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGT<br>TCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG<br>CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACG<br>TCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACA<br>AGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG<br>ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACC<br>ACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCA<br>AGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCT<br>ACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAA<br>CAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAA<br>TCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACG<br>GAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCA | |

【表３６－８２】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCC<br>AGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACA<br>AGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCG<br>ACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGG<br>GAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCA<br>TGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGG<br>GATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCC<br>TGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAC<br>TGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGT<br>ACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAAC<br>AGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCG<br>AACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGG<br>ACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAC<br>AGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGG<br>CAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCA<br>CAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGT<br>ACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCC<br>CGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATT<br>TCTATTAAAGGTTCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA<br>TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTT<br>TCATTGCCTCGAG | |
| XBG からの 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 Cas9 転写物 | GGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTGCCACCATGGACA<br>AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAG<br>TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA<br>ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG<br>ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA<br>GATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA<br>ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT<br>TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA<br>TCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA<br>GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC<br>TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG<br>ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCC<br>AGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG<br>ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA<br>ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACC<br>TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC<br>TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC<br>TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGG<br>CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA<br>ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG<br>ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC<br>TGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG<br>CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCA<br>AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA<br>ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCC<br>CGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG | 259 |

10 20 30 40

【表３６－８３】

| | | |
|---|---|---|
| | ACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA | |
| | CATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT | |
| | TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG | |
| | AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA | |
| | CAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCC | |
| | TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG | |
| | TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG | |
| | CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC | |
| | TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA | |
| | GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC | |
| | TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACA | |
| | TCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGA | |
| | TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGA | |
| | AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC | |
| | TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC | |
| | TGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG | |
| | ACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG | |
| | GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA | |
| | AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA | |
| | TGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC | |
| | AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCG | |
| | AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG | |
| | AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG | |
| | GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT | |
| | ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG | |
| | ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACG | |
| | TCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC | |
| | TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG | |
| | AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC | |
| | TGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA | |
| | GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG | |
| | TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT | |
| | TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC | |
| | TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA | |
| | GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCG | |
| | CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA | |
| | GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA | |
| | TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCT | |
| | GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC | |
| | AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG | |
| | AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG | |
| | ACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA | |
| | GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA | |
| | GCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAA | |
| | AGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG | |
| | ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA | |
| | GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG | |
| | CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA | |

【表３６－８４】

| | | |
|---|---|---|
| | AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAAC<br>AGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA<br>AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA<br>ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC<br>TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA<br>CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA<br>CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA<br>GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCT<br>AGCTAGCACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAAT<br>ACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCGTAT<br>CTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCGAG | |
| CleanCap(商標)と共に使用するための最初の3ヌクレオチドとしてのAGG、XBGからの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Cas9転写物 | AGGAAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCCGGATCTGCCACCATGGACA<br>AGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAG<br>TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAA<br>ACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG<br>ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAA<br>GATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCA<br>ACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCT<br>TCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACA<br>TCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGA<br>GAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC<br>TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAG<br>ACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCC<br>AGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG<br>ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAA<br>ACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACC<br>TGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC<br>TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACC<br>TGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGG<br>CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA<br>ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACG<br>ACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC<br>TGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACG<br>CAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCA<br>AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA<br>ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCC<br>CGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG<br>ACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA<br>CATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGAT<br>TCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCG<br>AAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGA<br>CAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCC<br>TGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACG<br>TCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG<br>CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGC<br>TGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCA<br>GCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGC | 260 |

10 20 30 40

【表３６－８５】

| | | |
|---|---|---|
| | TGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACA<br>TCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGA<br>TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGA<br>AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGC<br>TGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCC<br>TGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG<br>ACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGG<br>GAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCA<br>AGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCA<br>TGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACC<br>AGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCG<br>AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG<br>AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACG<br>GAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACT<br>ACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG<br>ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACG<br>TCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGC<br>TGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG<br>AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGC<br>TGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCA<br>GAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG<br>TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGT<br>TCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACC<br>TGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA<br>GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCG<br>CAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACA<br>GCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA<br>TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCT<br>GGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGC<br>AGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGG<br>AAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGG<br>ACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA<br>GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA<br>GCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAA<br>AGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG<br>ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAA<br>GAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGG<br>CACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA<br>AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAAC<br>AGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCA<br>AGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACA<br>ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACC<br>TGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACA<br>CAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAA<br>CACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGA<br>GCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCT<br>AGCTAGCACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTACATAAT | |

【表３６－８６】

| | | |
|---|---|---|
| | ACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAAAATGTAGCCATTCGTAT<br>CTGCTCCTAATAAAAAGAAAGTTTCTTCACATTCTCTCGAG | |
| CleanCap(商標)と共に使用するための最初の3ヌクレオチドとしてのAGG、HSDからの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Cas9転写物 | AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTT<br>GCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACT<br>GGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA<br>GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCAT<br>CAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGA<br>AGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA<br>CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGA<br>CGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAA<br>GAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA<br>CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAG<br>CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT<br>CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG<br>CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTT<br>CGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG<br>CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC<br>GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGG<br>ACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCT<br>GCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACA<br>GATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGA<br>CGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGC<br>ACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT<br>GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGA<br>AATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGG<br>AGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT<br>GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAG<br>AAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGG<br>AGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAA<br>GGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTA<br>CGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAA<br>GAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGG<br>AGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCT<br>GCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCAC<br>AGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAA<br>GCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTT<br>CAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAA<br>GAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATT<br>CAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA<br>GGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCT<br>GACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGAC<br>ATACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAG<br>ATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA<br>CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGC<br>AAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA<br>AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA<br>CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC | 261 |

【表３６－８７】

| | | |
|---|---|---|
| | AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGA<br>AAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACA<br>GAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACT<br>GGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAA<br>CGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGA<br>CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGT<br>CCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAG<br>AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT<br>CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCAC<br>ACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGA<br>ACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGAT<br>CACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGA<br>CGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAA<br>GCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAAT<br>CAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC<br>AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGA<br>CTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAAT<br>CGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT<br>CAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGAT<br>CGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT<br>CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAA<br>GACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAG<br>AAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA<br>CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAA<br>GGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGG<br>AATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCT<br>GGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCC<br>GAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAG<br>CGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT<br>CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGA<br>AGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGA<br>CGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA<br>CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCC<br>GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCT<br>GGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAG<br>ATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCAT<br>CACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGG<br>AGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAA<br>AAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAG<br>CTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTA<br>AAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATT<br>AATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG | |
| 30/30/39 ポリA配列 | 使用されない | 262 |
| ポリA 100配列 | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA<br>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA | 263 |

【表３６－８８】

| | | |
|---|---|---|
| マウス TTR 遺伝子を標的化する G209 シングルガイド RNA | AAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGAGCCACC | 264 |
| 最少ウリジンコドンを使用し、開始コドンおよび終止コドンを有するナイセリア・メニンギチジス (Neisseria meningitidis) Cas9 をコードする ORF | ATGGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATC<br>GGAATCGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAAC<br>CCGATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTC<br>CCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTC<br>AGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTG<br>CTGAAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTG<br>ATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGAC<br>AGAAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAG<br>CACAGAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAG<br>GAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAG<br>ACAGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAG<br>GAATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCG<br>AGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAA<br>TTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTG<br>CTGATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTG<br>GGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATAC<br>ACAGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTG<br>GAACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATG<br>GACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTG<br>CTGGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGAC<br>AACGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCG<br>AGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTG<br>TCGCCGGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACA<br>GACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTG<br>GAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTG<br>AAGGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGAC<br>GAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAA<br>GAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTC<br>GTCCTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGA<br>AGATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGA<br>AAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGA<br>AAGGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTC<br>GTCGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAG<br>CAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTG<br>AACGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACA<br>TGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAG<br>AACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACTCG<br>AGAGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGA<br>TCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAG<br>GAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCCTGTGCCAGTTC<br>GTCGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCA<br>TCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAG<br>GTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCA<br>TGCTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAG | 265 |

【表３６－８９】

| | | |
|---|---|---|
| | GAAATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTC<br>CTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAA<br>GTCATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAA<br>GCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCG<br>AGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCA<br>CCGAACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCA<br>AAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTG<br>AAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTG<br>TACGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAG<br>GCATTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAG<br>CAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTC<br>AGAAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTC<br>TTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTC<br>GCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAA<br>GACTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCG<br>AACGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGATACTTC<br>GCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTG<br>GACCACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACA<br>GCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGA<br>CCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCA<br>GACGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGA | |
| 最少ウリジンコドンを使用するナイセリア・メニンギチジス(Neisseria meningitidis) Cas9 をコードする ORF(開始コドンおよび終止コドンのいずれもなし；融合タンパク質コーディング配列に含めるために好適) | GCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATCGGA<br>ATCGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCG<br>ATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCG<br>AAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGA<br>AGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTG<br>AAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTGATC<br>AAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGA<br>AAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCAC<br>AGAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGAA<br>CTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGACA<br>GGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAA<br>TCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAGA<br>AAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAATTC<br>GGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTG<br>ATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGGA<br>CACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACA<br>GCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAA<br>CAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGAC<br>GAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTG<br>GGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAAC<br>GCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAGA<br>GCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTCG<br>CCGGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGAC<br>GAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGAA<br>GCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAG<br>GCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAA<br>GCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAGAA | 266 |

【表３６－９０】

| | | |
|---|---|---|
| | AAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTC<br>CTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGA<br>TACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGAAAG<br>TCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAG<br>GACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTC<br>GGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCAG<br>CACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAAC<br>GAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGG<br>GACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAGAAC<br>AAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACTCGAGA<br>GAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCG<br>AAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGAA<br>AGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCCTGTGCCAGTTCGTC<br>GCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCG<br>AACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGTC<br>AGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCATGC<br>TCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGAA<br>ATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCTG<br>CACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTC<br>ATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCA<br>GACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAGA<br>CCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCG<br>AACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAG<br>AGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTGAAG<br>CTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTAC<br>GAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCA<br>TTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCAG<br>GTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGA<br>AACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTC<br>GAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTCGCA<br>AAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGAC<br>TGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAAC<br>GACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGATACTTCGCA<br>TCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGAC<br>CACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCA<br>CTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACCG<br>TGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGAC<br>GGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAA | |
| 配列番号:265を含む転写物(ナイセリア・メニンギチジス(Neisseria meningitidis)Cas9をコードする) | GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGATCCGCCACCAT<br>GGCAGCATTCAAGCCGAACTCGATCAACTACATCCTGGGACTGGACATCGG<br>AATCGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCC<br>GATCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCC<br>GAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAG<br>AAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCT<br>GAAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACTTCGACGAAAACGGACTGAT<br>CAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGCAGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAG<br>AAAGCTGACACCGCTGGAATGGTCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCA<br>CAGAGGATACCTGTCGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGA | 267 |

【表３６－９１】

| | | |
|---|---|---|
| | ACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCACACGCACTGCAGAC<br>AGGAGACTTCAGAACACCGGCAGAACTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGA<br>ATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGAG<br>AAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTCGAAAAGCAGAAGGAATT<br>CGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCT<br>GATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTGGG<br>ACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACAC<br>AGCAGAAAGATTCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGA<br>ACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACACTGATGGA<br>CGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCT<br>GGGACTGGAAGACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAA<br>CGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCTCGAG<br>AGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTC<br>GCCGGAACTGCAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGA<br>CGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAATCCTGGA<br>AGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAA<br>GGCACTGAGAAGAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGA<br>AGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACACAGAAGA<br>AAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGT<br>CCTGAGAGCACTGTCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAG<br>ATACGGATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGTCGGAAA<br>GTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAA<br>GGACAGAGAAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGT<br>CGGAGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACGAACAGCA<br>GCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAA<br>CGAAAAGGGATACGTCGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATG<br>GGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTGGGATCGGAAAACCAGAA<br>CAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTCAACGGAAAGGACAACTCGAG<br>AGAATGGCAGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATC<br>GAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGATTCAAGGA<br>AAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAACAGATTCCTGTGCCAGTTCGT<br>CGCAGACAGAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATC<br>GAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTGAGAAAGGT<br>CAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACTGGACGCAGTCGTCGTCGCATG<br>CTCGACAGTCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAGATTCGTCAGATACAAGGA<br>AATGAACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGAGAAGTCCT<br>GCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGT<br>CATGATCAGAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGC<br>AGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTGTCGTCGAG<br>ACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCACACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACC<br>GAACAGAAAGATGTCGGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAA<br>GAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACACAGCTGAA<br>GCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTA<br>CGAAGCACTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGC<br>ATTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAGAACACAGCA<br>GGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAG<br>AAACCACAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTT<br>CGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTGGCAGGTCGC | |

【表３６－９２】

| | | |
|---|---|---|
| | AAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGA<br>CTGGCAGCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAA<br>CGACCTGGTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTCGGATACTTCGC<br>ATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGA<br>CCACAAGATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGC<br>ACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGGAAATCAGACC<br>GTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGA<br>CGGATCGGAATTCGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGATAGCT<br>AGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC<br>CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGA<br>CCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTG<br>CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC<br>AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG<br>CGGTGGGCTCTATGG | |
| ナイセリア・メニンギチジス(Neisseria meningitidis) Cas9 のアミノ酸配列 | MAAFKPNSINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRVFERAEV<br>PKTGDSLAMARRLARSVRRLTRRRAHRLLRTRRLLKREGVLQAANFDENGL<br>IKSLPNTPWQLRAAALDRKLTPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADK<br>ELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHTFS<br>RKDLQAELILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKML<br>GHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLM<br>DEPYRKSKLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAIS<br>RALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEIL<br>EALLKHISFDKFVQISLKALRRIVPLMEQGKRYDEACAEIYGDHYGKKNTE<br>EKIYLPPIPADEIRNPVVLRALSQARKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVG<br>KSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPKSKDILKLRLYEQ<br>QHGKCLYSGKEINLGRLNEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQ<br>NKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKKQRILLQKFDEDGFK<br>ERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTGKGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRK<br>VRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEV<br>LHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRTLLAEKLSS<br>RPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSAKRLDEGVSVLRVPLTQL<br>KLKDLEKMVNREREPKLYEALKARLEAHKDDPAKAFAEPFYKYDKAGNRTQ<br>QVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYSWQV<br>AKGILPDRAVVQGKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMFGYF<br>ASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFQKYQIDELGKEIR<br>PCRLKKRPPVRSGKRTADGSEFESPKKKRKVE | 268 |
| ラット TTR 遺伝子を標的化する G390 シングルガイド RNA | mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 269 |
| trRNA | AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU<br>GGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU | 270 |
| | 使用されない | 271 |
| ラット TTR 遺伝子を標的化する G534 シングルガイド RNA | mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm<br>UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA<br>mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 272 |

【表３６－９３】

| | | |
|---|---|---|
| GOOO395 5’ 切断不活性 sgRNA 修飾配列 | mG*mC*mA*AUGGUGUAGCGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU | 273 |
| SV40 NLS | PKKKRKV | 274 |
| 代替的な SV40 NLS | PKKKRRV | 275 |
| ヌクレオプラスミン NLS | KRPAATKKAGQAKKKK | 276 |
| 例示的な Kozak 配列 | gccRccAUGG | 277 |
| 例示的な Kozak 配列 | gccgccRccAUGG | 278 |

*=PS 連結；’m’=2’-O-Me ヌクレオチド

【図１】

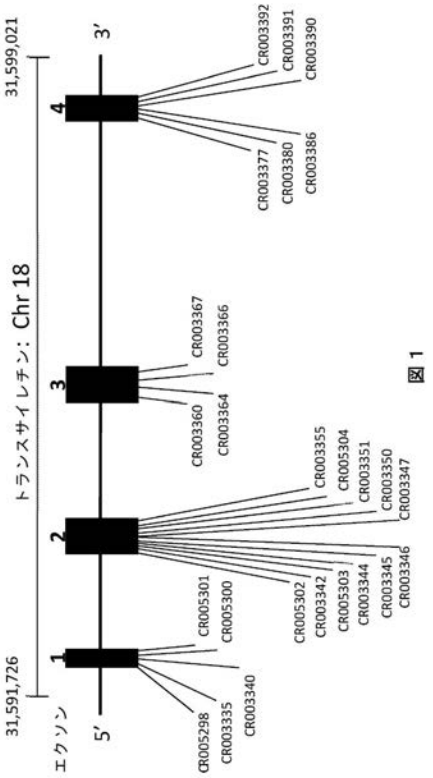



図１

【図２】

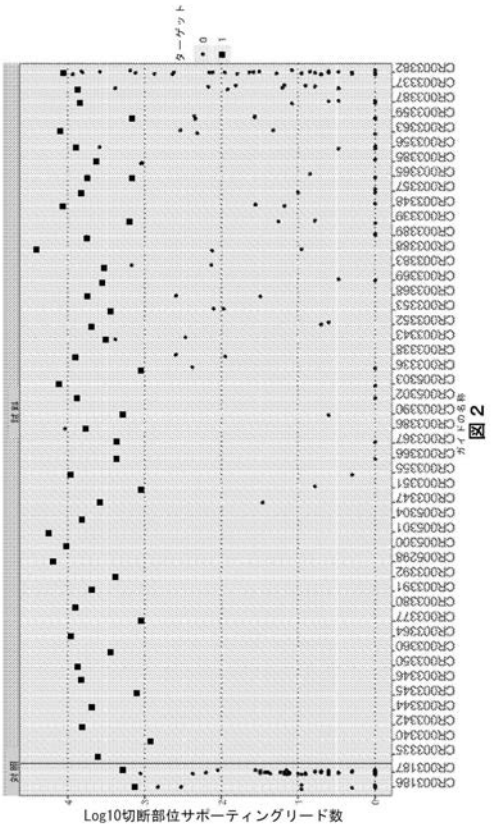



図２

【図３】

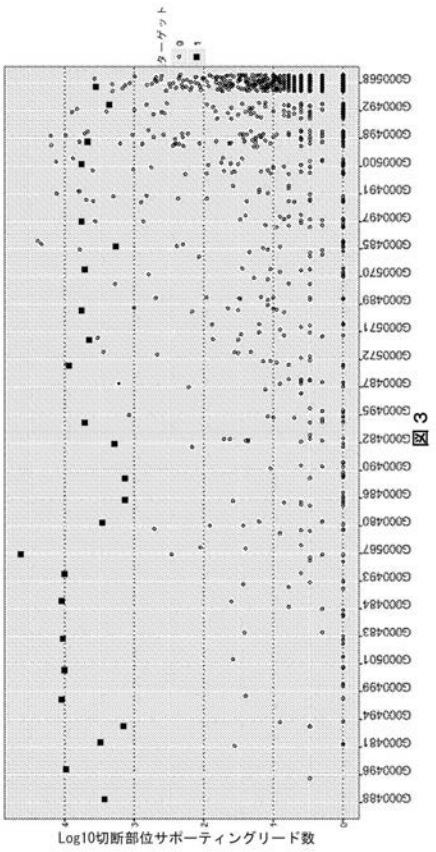


図３

【図４】

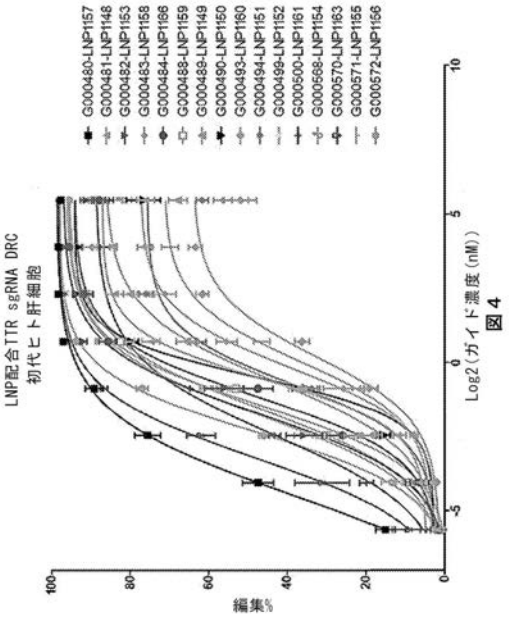


図４

【図５】

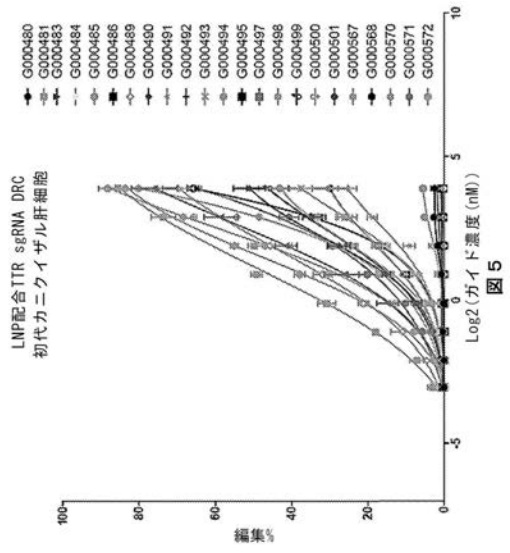


図５

【図６】

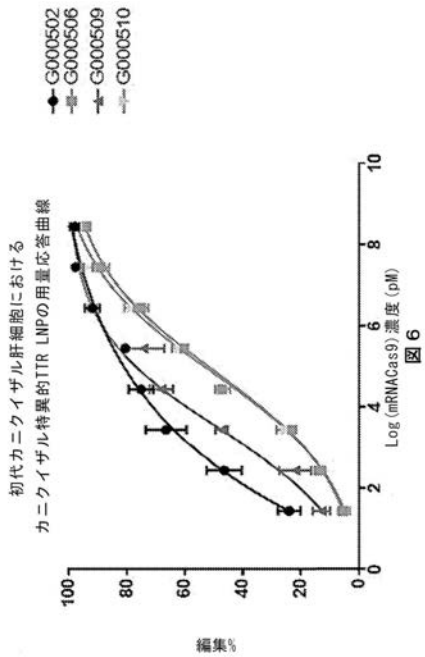


図６

【図７】

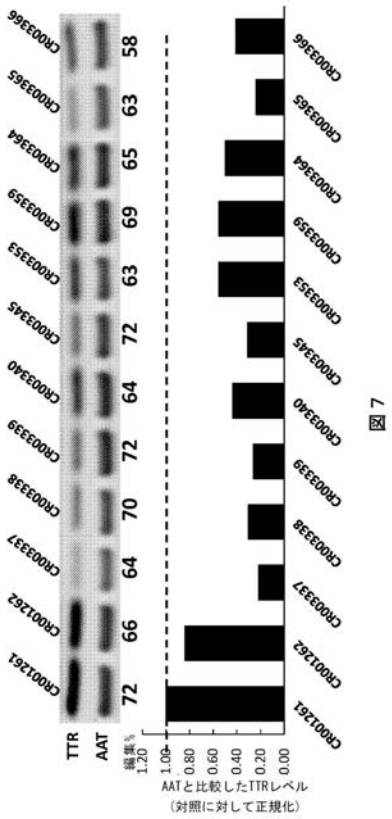



図７

【図８】

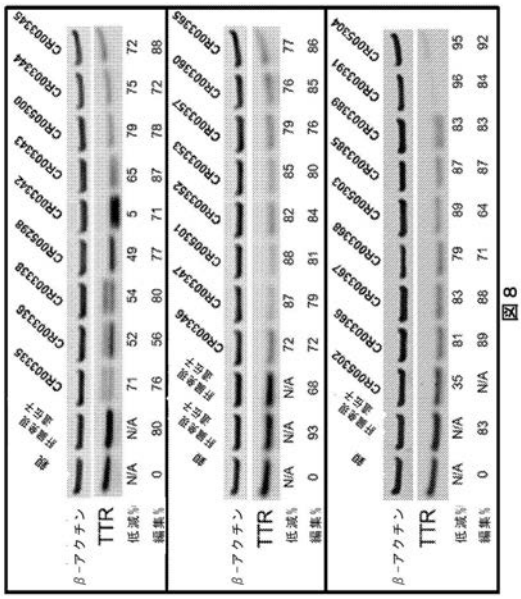



図８

【図９】

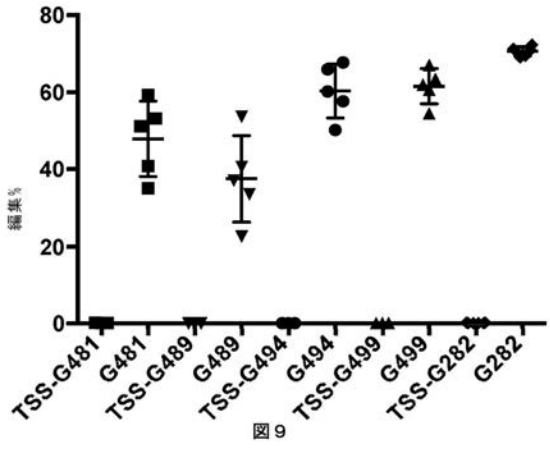



図９

【図１０Ａ】

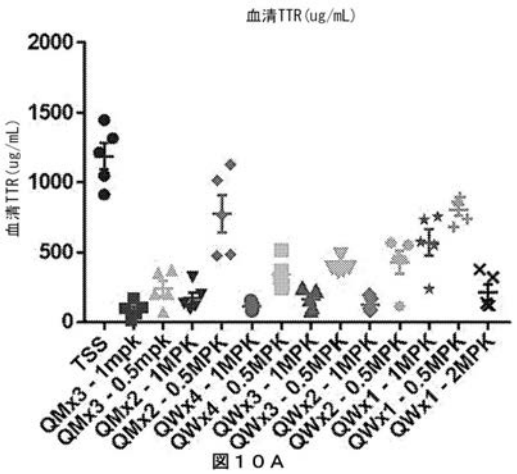



図１０Ａ

【図１０Ｂ】

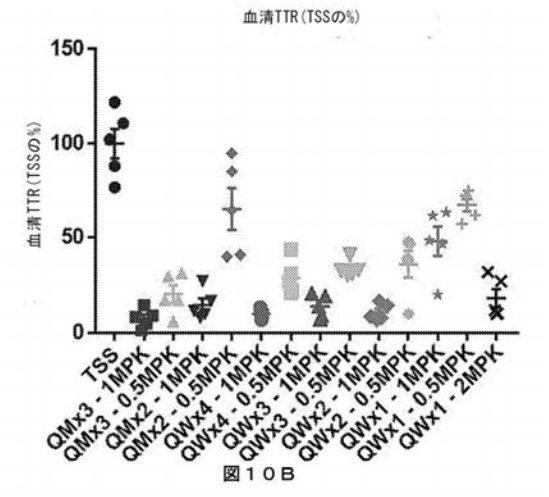


図１０Ｂ

【図１１Ａ】

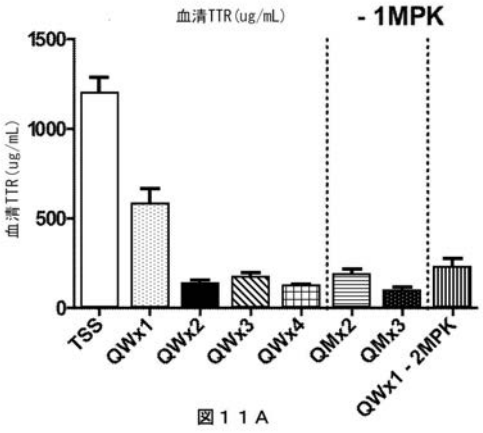


図１１Ａ

【図１１Ｂ】

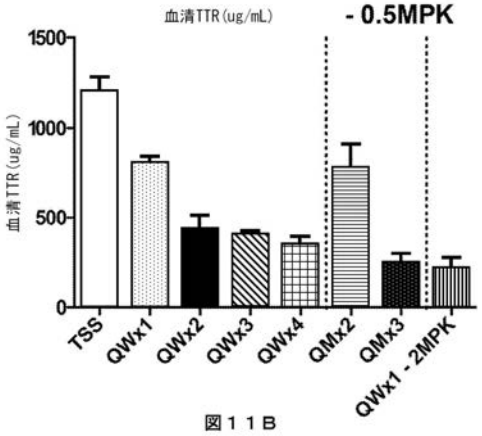


図１１Ｂ

【図１２Ａ】

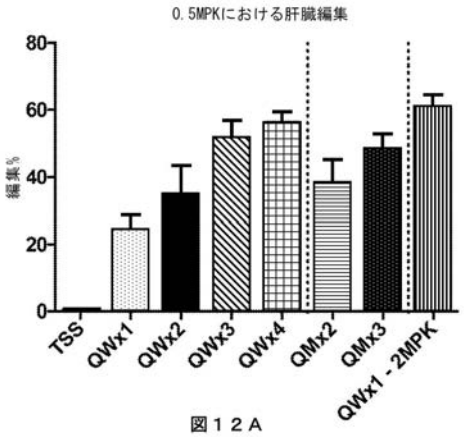


図１２Ａ

【図１２Ｂ】

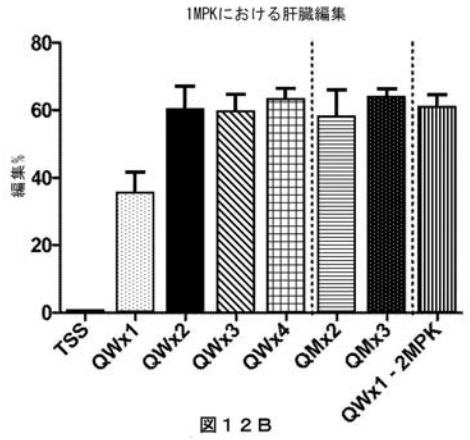



図１２Ｂ

【図１２Ｃ】

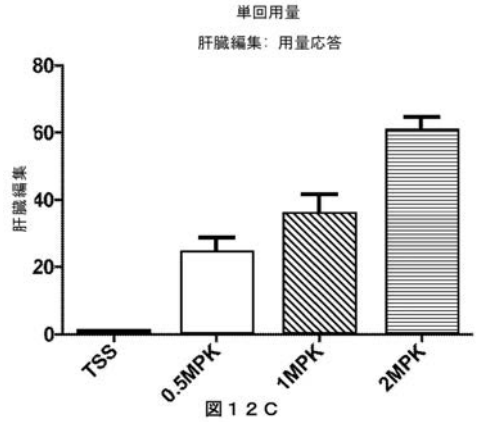



図１２Ｃ

【図１３】

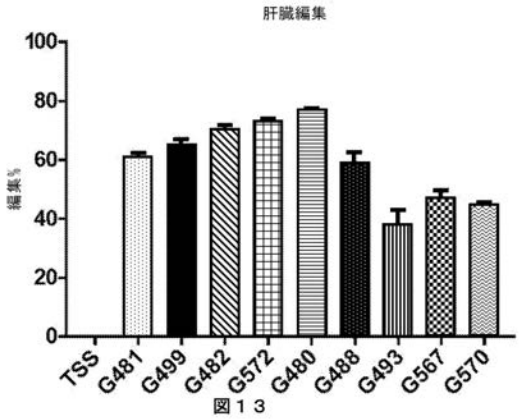



図１３

【図１４Ａ】

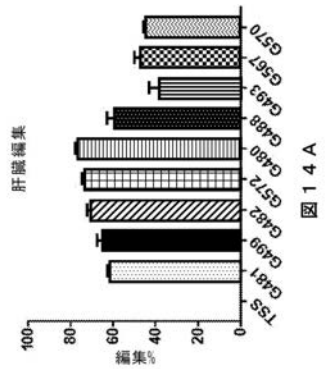



図１４Ａ

【図１４Ｂ】

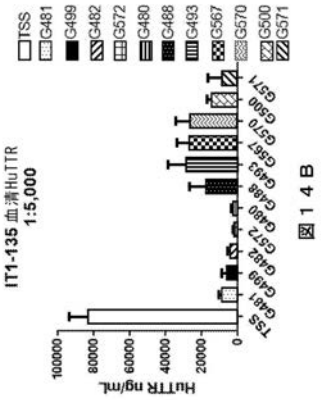



図１４Ｂ

【図１５Ａ】

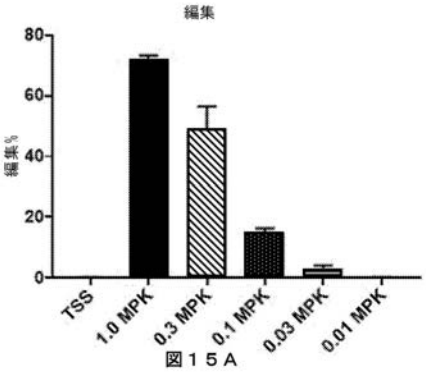



図１５Ａ

【図１５Ｂ】

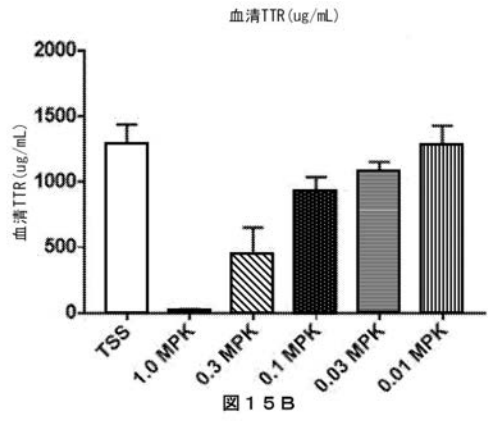



図１５Ｂ

【図１６】

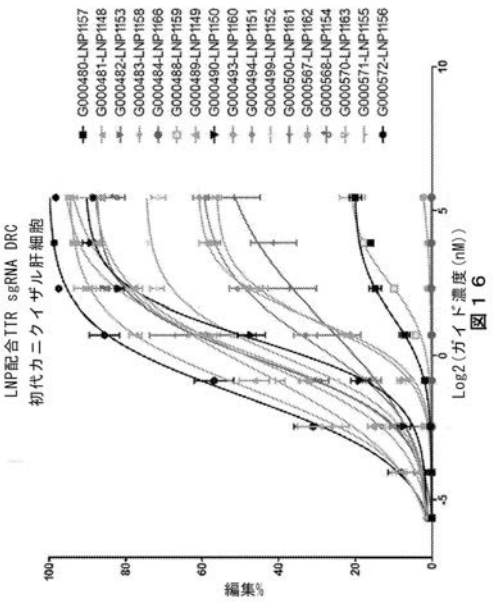



図１６

【図１７】

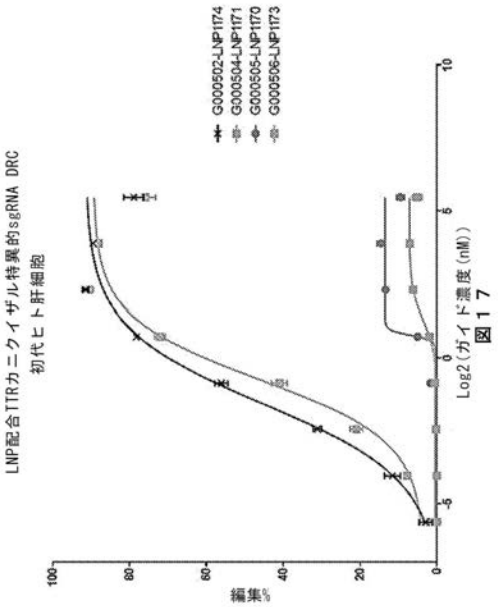



図１７

【図１８】

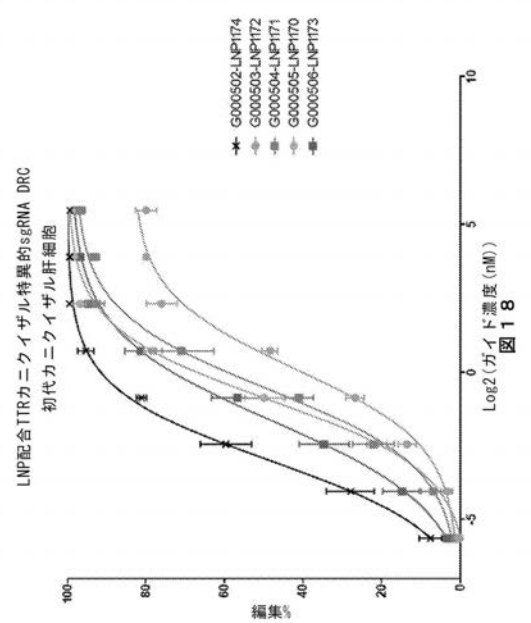



図１８

【図１９Ａ】

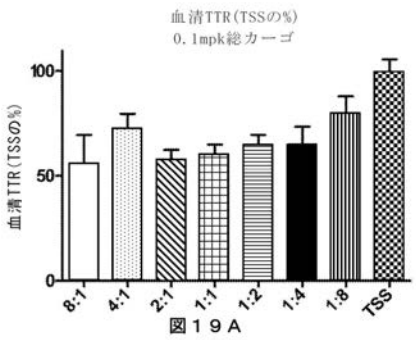



図１９Ａ

【図１９Ｂ】

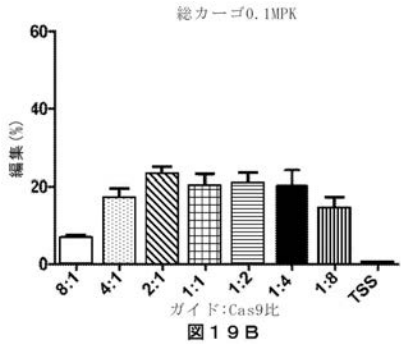



図１９Ｂ

【図１９Ｃ】

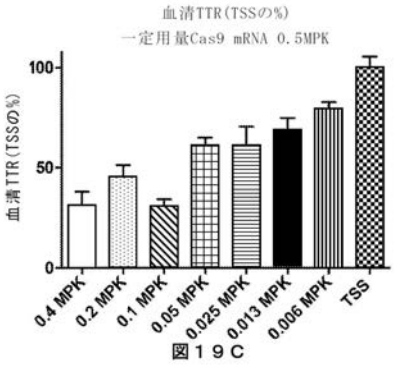



図１９Ｃ

【図１９Ｄ】

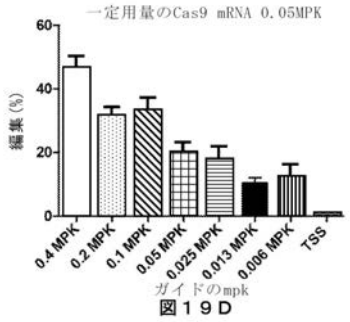



図１９Ｄ

【図２０】

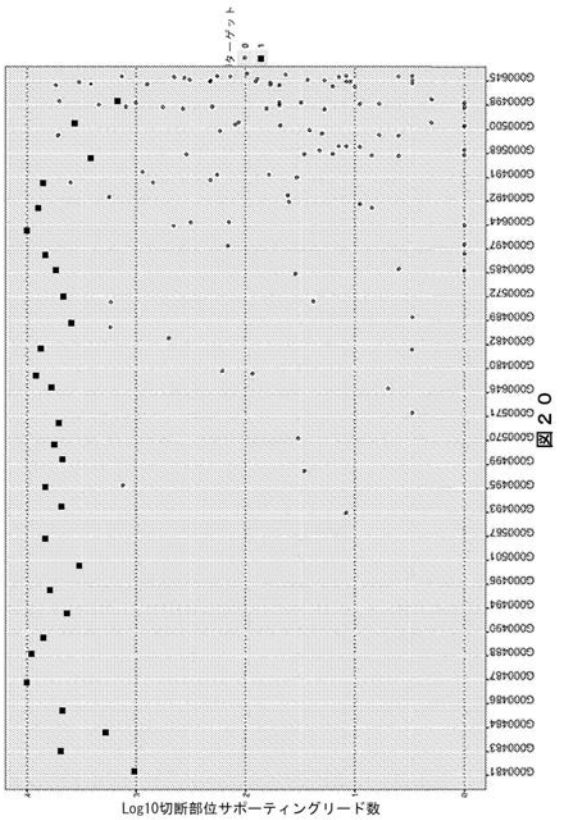



図２０

【図２１Ａ】

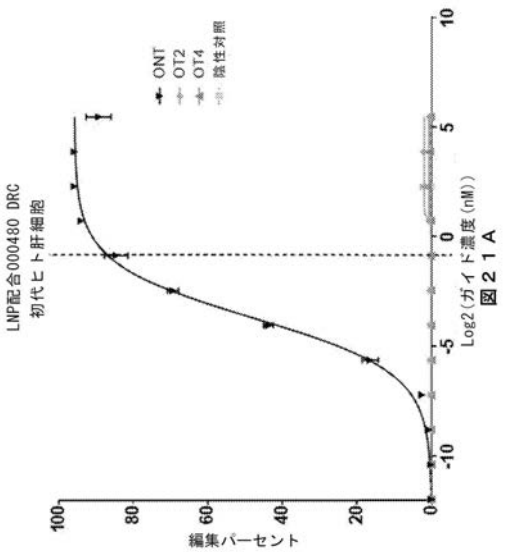



図２１Ａ

【図２１Ｂ】

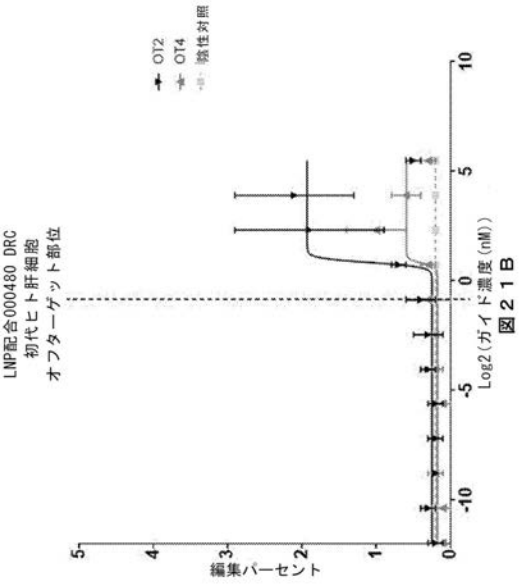



図２１Ｂ

【図２２Ａ】

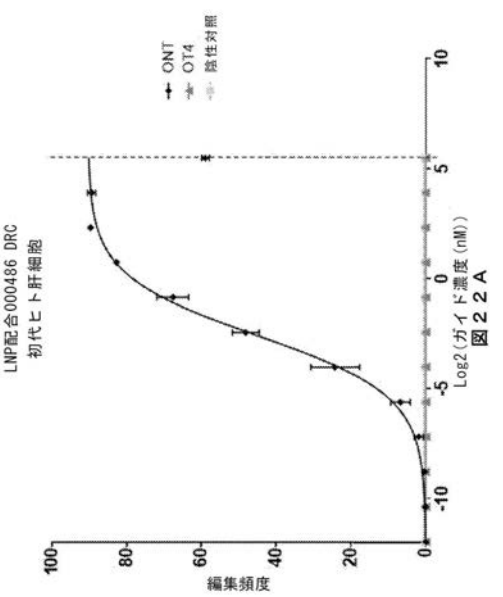



図２２Ａ

【図２２Ｂ】

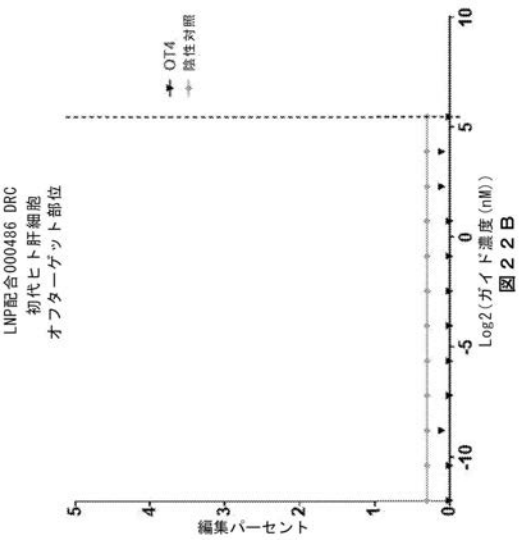



図２２Ｂ

【図２３Ａ】

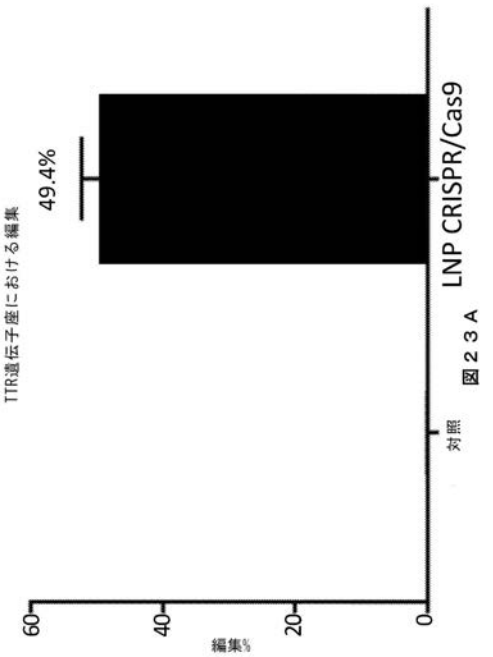



図２３Ａ

【図２３Ｂ】

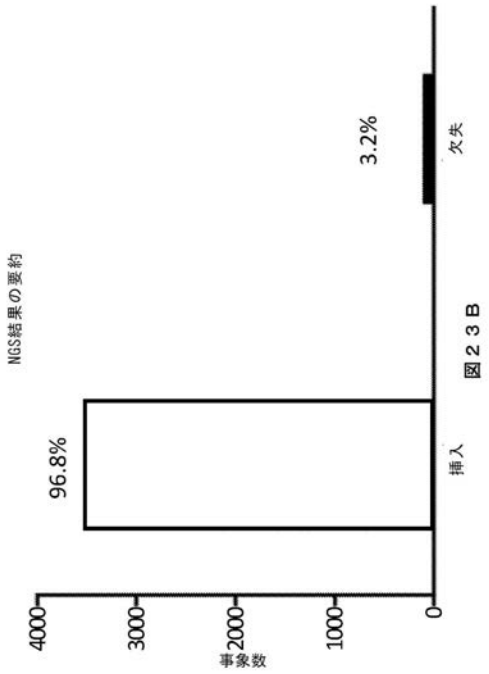



図２３Ｂ

【図２４Ａ】

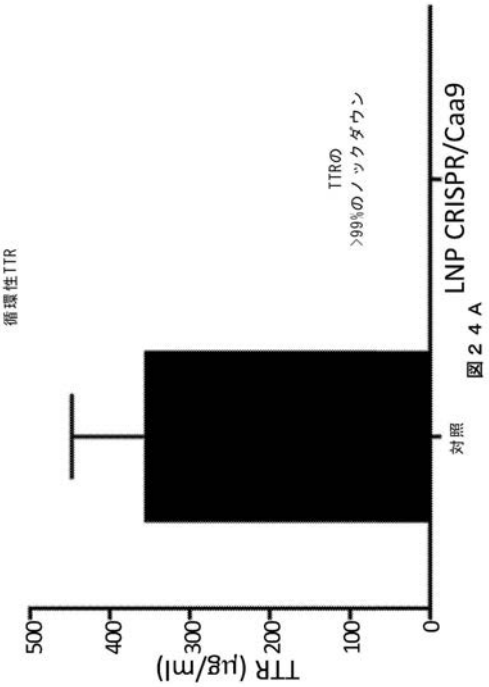



図２４Ａ

【図２４Ｂ】

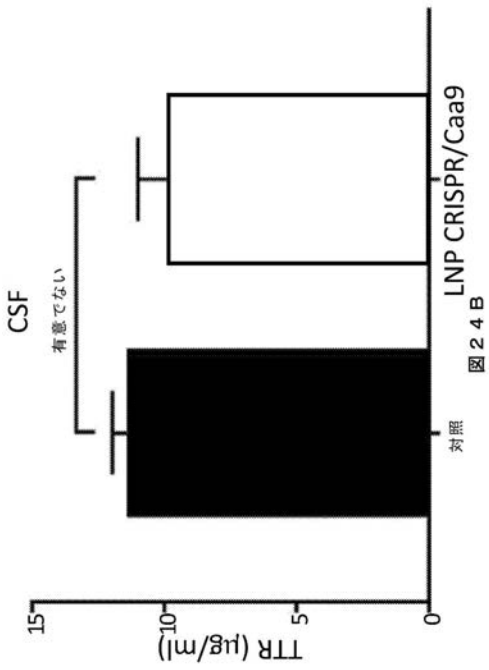



図２４Ｂ

【図２５Ａ】

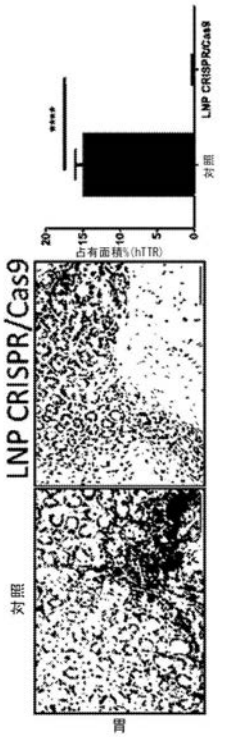



図２５Ａ

【図２５Ｂ】

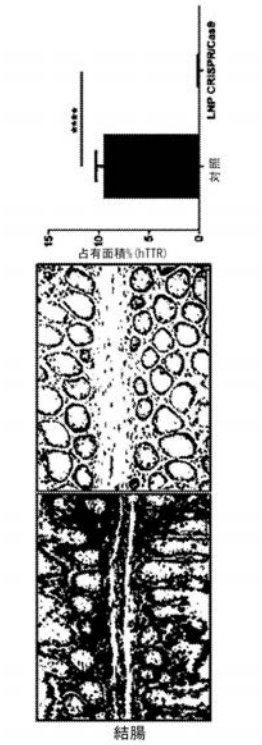



図２５Ｂ

【図２５Ｃ】

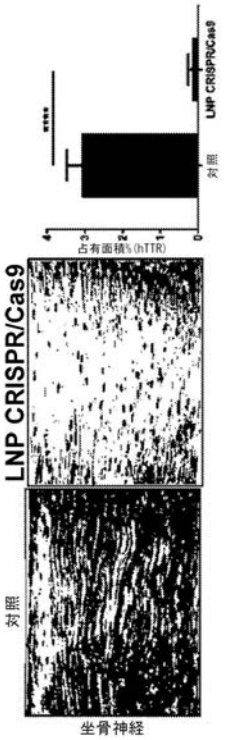



図２５Ｃ

【図２５Ｄ】




図２５Ｄ

【図２６Ａ】

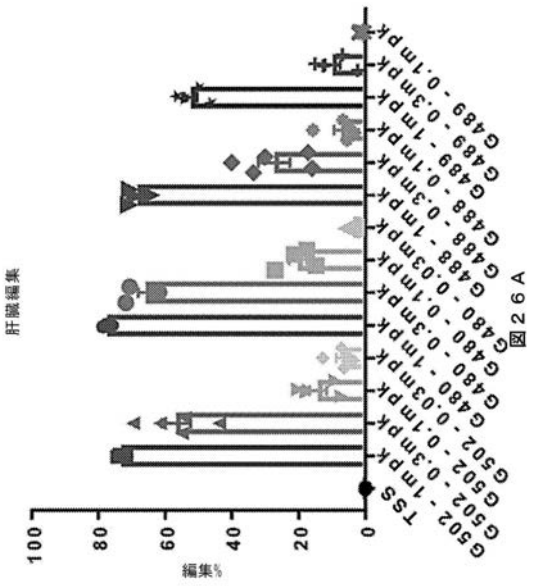



図２６Ａ

【図２６Ｂ】

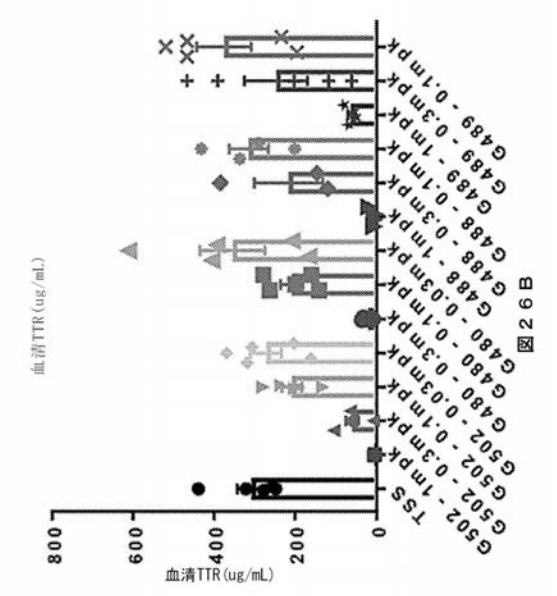



図２６Ｂ

【図２６Ｃ】

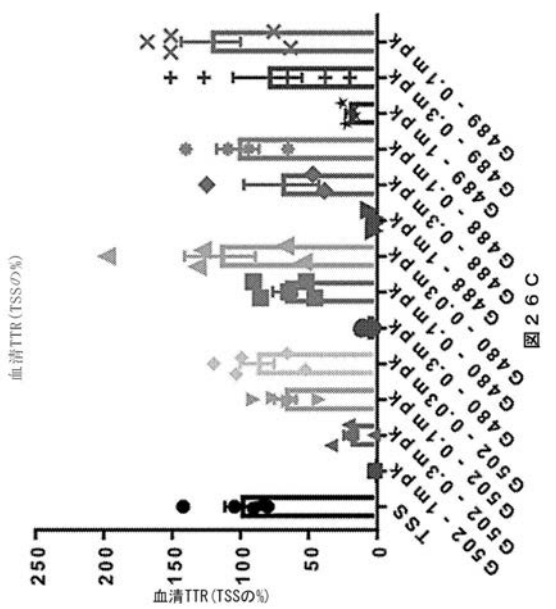



図２６Ｃ

【図２７Ａ】

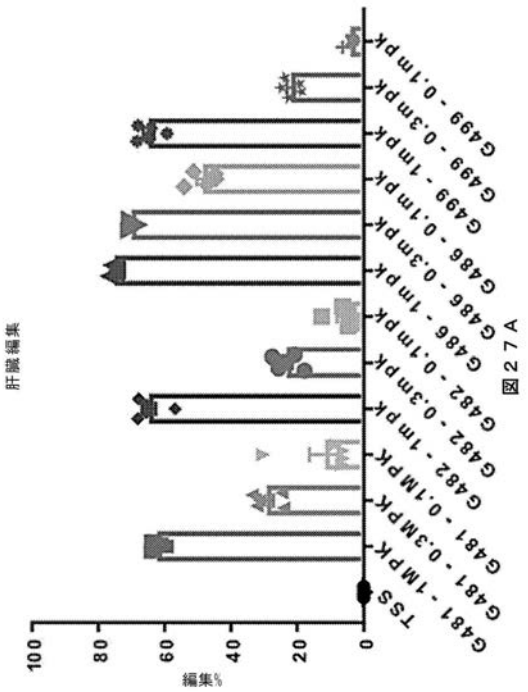



図２７Ａ

【図２７Ｂ】

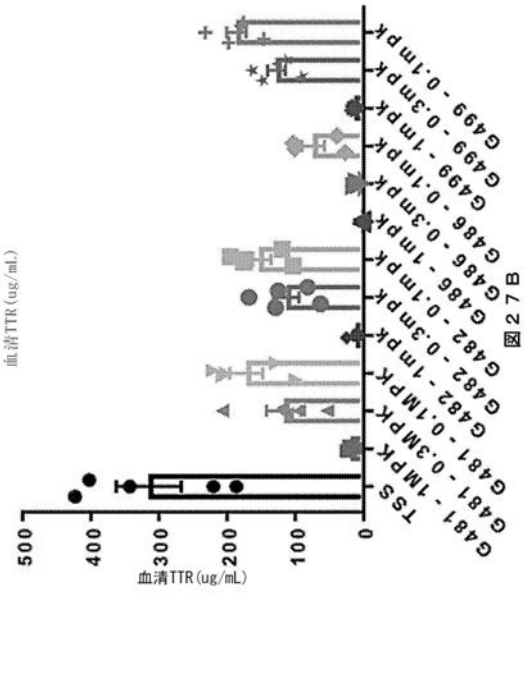



図２７Ｂ

【図２７Ｃ】

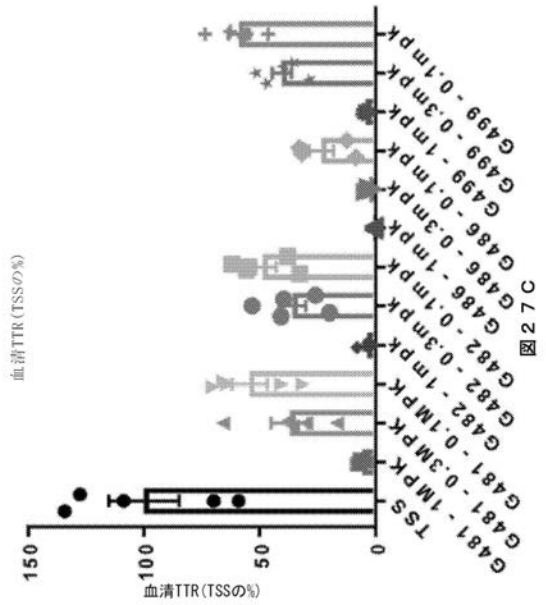


図２７Ｃ

【図２８Ａ】

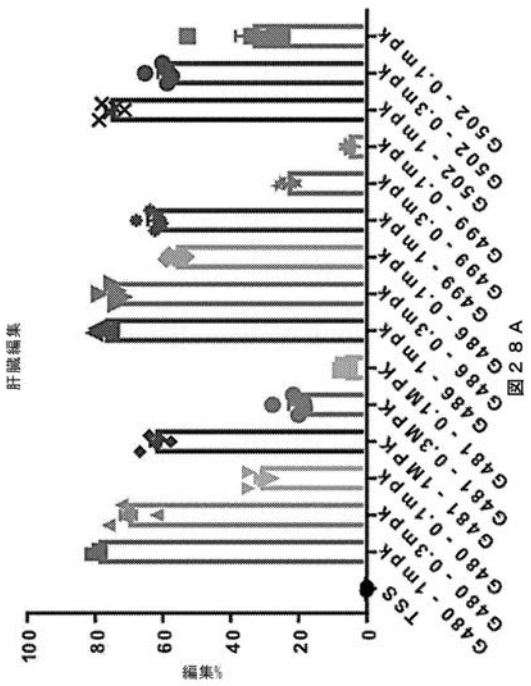


図２８Ａ

【図２８Ｂ】

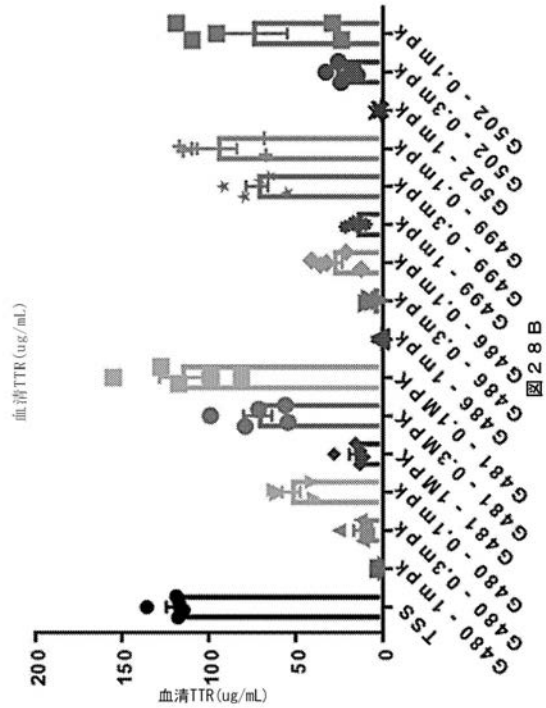


図２８Ｂ

【図２８Ｃ】

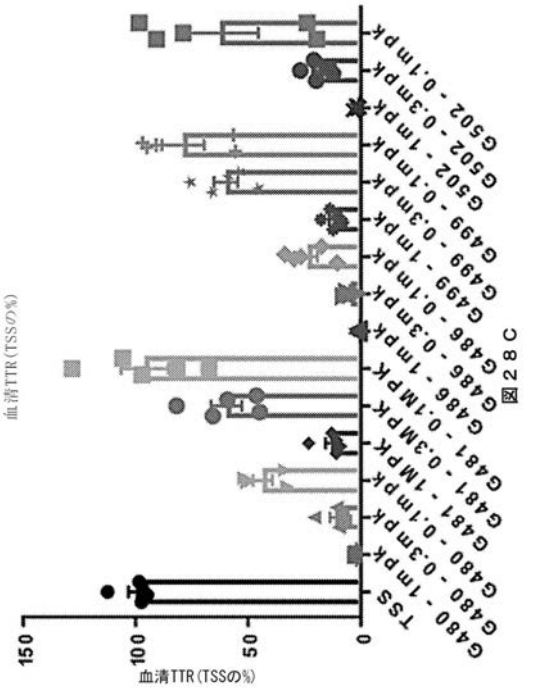
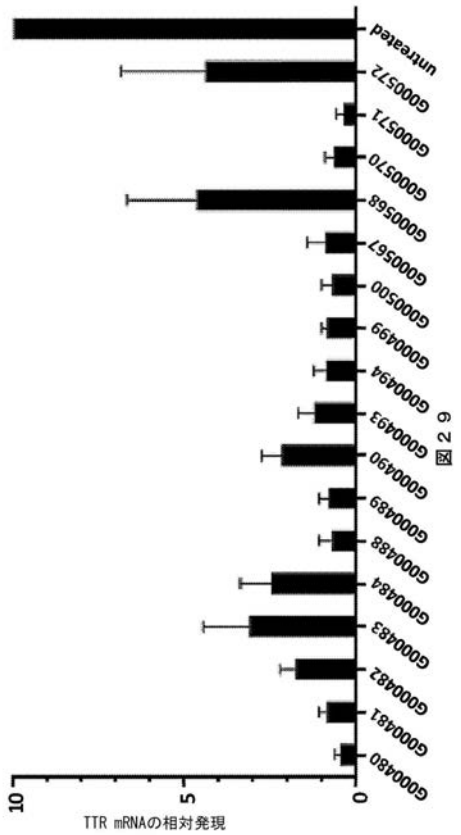
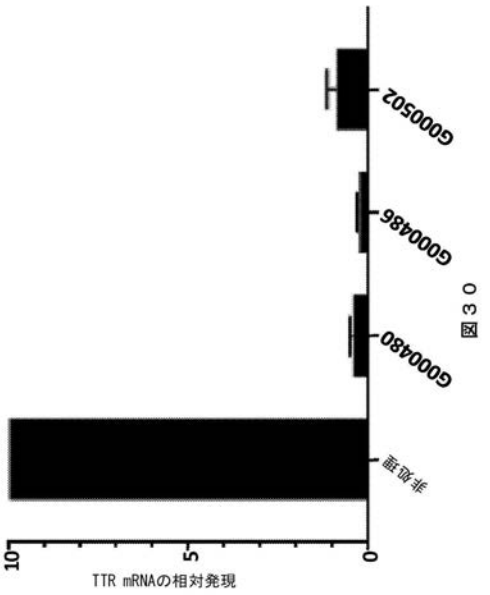


図２８Ｃ

【図２９】




【図３０】




【配列表】
2021500864000001.app

【国際調査報告】

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/053382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 C12N15/10 A61K48/00 A61P25/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 2017/077386 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 11 May 2017 (2017-05-11) | 1,2,6-9, 13, 16-19, 34-37, 41,42, 47,65, 75-83, 86-88, 93,94, 99-103, 106 |
| Y | examples 79-84; sequences 51742,51743,51871 sequence 51848 | 3-5, 10-12, 14,15, 20-33, 43-46, 48-64, 66-74, 84,85, |
| | -/-- | |

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 12 December 2018 | 11/02/2019 |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016 | Bucka, Alexander |

1

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/053382

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2018/053382

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

131(completely); 1-37, 41-130, 209(partially)

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2018/ 053382

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 131(completely); 1-37, 41-130, 209(partially)

A method of inducing a double-stranded break (DSB) within the TTR gene, comprising delivering a composition to a cell, wherein the composition comprises a guide RNA comprising a guide sequence that is at least 90% identical to the guide sequence of SEQ ID NO: 5;
related methods using said guide RNA;
compositions comprising said guide RNA.

---

2-78. claims: 1-130, 132-209(all partially)

A method of inducing a double-stranded break (DSB) within the TTR gene, comprising delivering a composition to a cell, wherein the composition comprises a guide RNA;
related methods using said guide RNA;
compositions comprising said guide RNA,
wherein in each separate invention the guide RNA is selected from a guide sequence being at least 90% identical to the guide sequence of any one of SEQ ID NOs: 6 to 82.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No
PCT/US2018/053382

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| | | 89-92, 95-98, 104,105, 107-131, 209 |
| | ----- | |
| Y | WO 2017/053431 A2 (ARCTURUS THERAPEUTICS INC [US]) 30 March 2017 (2017-03-30)<br><br>paragraph [0232] - paragraph [0240]<br>paragraphs [0276], [0277], [0281] - [0285]; claims 1-14,33,41; examples 1,2<br>paragraph [0303] - paragraph [0311] | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| Y | Anonymous: "Intellia Therapeutics Company Overview",<br>Jefferies Healthcare Conference,<br>6 June 2017 (2017-06-06), XP055527492,<br>New York<br>Retrieved from the Internet:<br>URL:http://www.jefferies.com/CMSFiles/Jefferies.com/files/Intellia%20Therapeutics%20Inc(3).pdf<br>[retrieved on 2018-11-27]<br>page 9 - page 11<br>page 13 - page 16 | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| A | WO 2014/204728 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; ZHANG FENG [U) 24 December 2014 (2014-12-24)<br>paragraph [0931] - paragraph [0934]; claims 1,30 | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| A | WO 2014/093622 A2 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; ZHANG FENG [U) 19 June 2014 (2014-06-19)<br>paragraph [0726] - paragraph [0729]; claims 1,30 | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| A | ARTHUR L. BEAUDET ET AL: "Gene-targeting pharmaceuticals for single-gene disorders",<br>HUMAN MOLECULAR GENETICS,<br>vol. 25, no. R1,<br>30 November 2015 (2015-11-30), pages R18-R26, XP055527515,<br>gb<br>ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddv476<br>table 1 | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| A | US 2016/046960 A1 (FRENDEWEY DAVID [US] ET AL) 18 February 2016 (2016-02-18)<br><br>sequence 2 | 1-37, 41-131, 209 |
| | ----- | |
| | -/-- | |

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/053382

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | NATALIE J. GALANT ET AL: "Transthyretin amyloidosis: an under-recognized neuropathy and cardiomyopathy", CLINICAL SCIENCE., vol. 131, no. 5, 17 February 2017 (2017-02-17), pages 395-409, XP055528027, GB ISSN: 0143-5221, DOI: 10.1042/CS20160413 the whole document | 1-37, 41-131, 209 |
| A | SEKIJIMA ET AL: "Recent progress in the understanding and treatment of transthyretin amyloidosis", JOURNAL OF CLINICAL PHARMACY AND THERAPEUTICS, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATION, OXFORD, GB, vol. 39, no. 3, 18 April 2014 (2014-04-18) , pages 225-233, XP002760949, ISSN: 0269-4727, DOI: 10.1111/JCPT.12145 the whole document | 1-37, 41-131, 209 |
| X,P | WO 2017/173054 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 5 October 2017 (2017-10-05) examples 1-9; table 14; sequence 107 | 1-37, 41-131, 209 |
| X,P | WO 2018/007871 A1 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 11 January 2018 (2018-01-11) claims 1-3; sequence 428 | 1-37, 41-131, 209 |
| X,P | JONATHAN D. FINN ET AL: "A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing", CELL REPORTS, vol. 22, no. 9, 27 February 2018 (2018-02-27), pages 2227-2235, XP055527484, ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.014 the whole document | 1-37, 41-131, 209 |

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/053382

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 2017077386 A1 | 11-05-2017 | BR 112018008971 A2 | 27-11-2018 |
| | | CA 2999649 A1 | 11-05-2017 |
| | | EP 3371305 A1 | 12-09-2018 |
| | | WO 2017077386 A1 | 11-05-2017 |
| WO 2017053431 A2 | 30-03-2017 | CA 3002647 A1 | 30-03-2017 |
| | | CN 108350454 A | 31-07-2018 |
| | | EP 3353298 A2 | 01-08-2018 |
| | | JP 2018527013 A | 20-09-2018 |
| | | US 2017080107 A1 | 23-03-2017 |
| | | WO 2017053431 A2 | 30-03-2017 |
| WO 2014204728 A1 | 24-12-2014 | BR 112015031611 A2 | 12-12-2017 |
| | | CA 2915845 A1 | 24-12-2014 |
| | | CN 105683379 A | 15-06-2016 |
| | | EP 3011032 A1 | 27-04-2016 |
| | | JP 2016523082 A | 08-08-2016 |
| | | KR 20160019553 A | 19-02-2016 |
| | | RU 2016101178 A | 19-11-2018 |
| | | SG 10201710488T A | 30-01-2018 |
| | | SG 11201510327T A | 28-01-2016 |
| | | US 2016153004 A1 | 02-06-2016 |
| | | WO 2014204728 A1 | 24-12-2014 |
| WO 2014093622 A2 | 19-06-2014 | AU 2013359199 A1 | 30-07-2015 |
| | | BR 112015013784 A2 | 11-07-2017 |
| | | CA 2894681 A1 | 19-06-2014 |
| | | CN 105164264 A | 16-12-2015 |
| | | DK 2931897 T3 | 05-02-2018 |
| | | EP 2931897 A2 | 21-10-2015 |
| | | EP 3327127 A1 | 30-05-2018 |
| | | ES 2658401 T3 | 09-03-2018 |
| | | HK 1215048 A1 | 12-08-2016 |
| | | HK 1220725 A1 | 12-05-2017 |
| | | JP 2016501531 A | 21-01-2016 |
| | | KR 20150105956 A | 18-09-2015 |
| | | SG 10201707569Y A | 30-10-2017 |
| | | SG 11201504523U A | 30-07-2015 |
| | | US 2014179770 A1 | 26-06-2014 |
| | | US 2014242699 A1 | 28-08-2014 |
| | | US 2015020223 A1 | 15-01-2015 |
| | | US 2017107536 A1 | 20-04-2017 |
| | | US 2017152528 A1 | 01-06-2017 |
| | | WO 2014093622 A2 | 19-06-2014 |
| US 2016046960 A1 | 18-02-2016 | AU 2015279642 A1 | 16-02-2017 |
| | | BR 112016030147 A2 | 30-01-2018 |
| | | CA 2953559 A1 | 30-12-2015 |
| | | CN 107002093 A | 01-08-2017 |
| | | DK 3161128 T3 | 05-11-2018 |
| | | EP 3161128 A2 | 03-05-2017 |
| | | ES 2694629 T3 | 26-12-2018 |
| | | HR P20181630 T1 | 25-01-2019 |
| | | JP 2017518758 A | 13-07-2017 |
| | | KR 20170023118 A | 02-03-2017 |
| | | LT 3161128 T | 25-10-2018 |
| | | SG 11201610633Q A | 27-01-2017 |
| | | US 2015376651 A1 | 31-12-2015 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/053382

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| | | US 2016046960 A1 | 18-02-2016 |
| | | US 2018251784 A1 | 06-09-2018 |
| | | WO 2015200805 A2 | 30-12-2015 |
| WO 2017173054 A1 | 05-10-2017 | AU 2017244143 A1 | 11-10-2018 |
| | | CA 3018978 A1 | 05-10-2017 |
| | | EP 3436077 A1 | 06-02-2019 |
| | | KR 20190002493 A | 08-01-2019 |
| | | TW 201802242 A | 16-01-2018 |
| | | WO 2017173054 A1 | 05-10-2017 |
| WO 2018007871 A1 | 11-01-2018 | NONE | |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｐ* | *25/02* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 25/02 | １０１ | |
| *Ａ６１Ｐ* | *29/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 29/00 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *9/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 9/04 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *1/16* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 1/16 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *38/46* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 38/46 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *45/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 45/00 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *48/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 48/00 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *35/76* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/76 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/7088* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/7088 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/7105* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/7105 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １２１ | |
| | | | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １０５ | |

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人　100104282
弁理士　鈴木　康仁
(72)発明者　カンジョリア，アルティ　マヘンドラ　プラカシュ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０
(72)発明者　オダテ，ショブ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０
(72)発明者　サイツァー，ジェシカ　リン
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０
(72)発明者　レスカーボ，レイナルド　マイケル
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０
(72)発明者　ストラップス，ウォルター
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２１３９，ケンブリッジ，エリー　ストリート　４０

Ｆターム(参考)　4B050 CC03 DD02 LL01
4C084 AA13 AA19 BA44 CA18 DC22 MA02 NA14 ZA081 ZA082 ZA211
ZA212 ZA361 ZA362 ZA371 ZA372 ZA751 ZA752 ZB211 ZB212 ZC211
ZC212 ZC75
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA14 ZA08 ZA21 ZA36 ZA37
ZA75 ZB21 ZC21 ZC75
4C087 AA01 BC83 MA02 NA14 ZA08 ZA21 ZA36 ZA37 ZA75 ZB21
ZC21 ZC75