

**(19)日本国特許庁(JP)**

(12) **公表特許公報(A)**

(11)公表番号

**特表2024-533940**

**(P2024-533940A)**

(43)公表日 令和6年9月18日(2024.9.18)

### (51) 國際特許分類

FI

**C12N 15/09 (2006.01)**

C 1 2 N      15/09      1 1 0

**C 1 2 N 15/113 (2010.01)**

C 1 2 N      15/113      Z Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全271頁)

|                   |                             |         |                         |
|-------------------|-----------------------------|---------|-------------------------|
| (21)出願番号          | 特願2024-502432(P2024-502432) | (71)出願人 | 522185863               |
| (86)(22)出願日       | 令和4年8月29日(2022.8.29)        |         | メタゲノミ, インク.             |
| (85)翻訳文提出日        | 令和6年3月15日(2024.3.15)        |         | アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル |
| (86)国際出願番号        | PCT/US2022/041755           |         | ニア州 エメリービル パーク・アベニュー    |
| (87)国際公開番号        | WO2023/028348               |         | ー 1 5 4 5               |
| (87)国際公開日         | 令和5年3月2日(2023.3.2)          | (74)代理人 | 110003797               |
| (31)優先権主張番号       | 63/237,791                  |         | 弁理士法人清原国際特許事務所          |
| (32)優先日           | 令和3年8月27日(2021.8.27)        | (72)発明者 | トーマス, ブライアン シー.         |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 |                             |         | アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル |
|                   | 米国(US)                      |         | ニア州 エメリービル パーク・アベニュー    |
| (31)優先権主張番号       | 63/245,629                  |         | ー 1 5 4 5               |
| (32)優先日           | 令和3年9月17日(2021.9.17)        | (72)発明者 | ブラウン, クリストファー           |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 |                             |         | アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォル |
|                   | 米国(US)                      |         | ニア州 エメリービル パーク・アベニュー    |
| (31)優先権主張番号       | 63/252,956                  |         | ー 1 5 4 5               |

最終頁に続く
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R U V Cドメインを有する酵素

(57) 【要約】

本開示は、際立ったドメイン特性を有するエンドヌクレアーゼ酵素、並びにそのような酵素又はそのバリエーションを使用する方法を提供する。

【選択図】 図 2 4

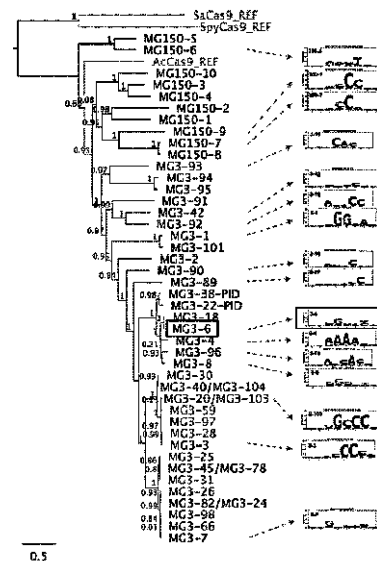


FIG. 24

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

細胞におけるベータ-2-ミクログロブリン（B2M）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクLEASE、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクLEASEと複合体を形成するように構成されており、かつ前記B2M遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、前記B2M遺伝子座の前記領域が、配列番号6387～6468のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

10

## 【請求項 2】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクLEASEである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、HNHドメインを更に含む、請求項3に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6305～6386のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、方法。

## 【請求項 6】

前記B2M遺伝子座の前記領域が、配列番号6388、6399、6401、6403、6410、6413、6421、6446、及び6448のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 7】

細胞におけるT細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクLEASE、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクLEASEと複合体を形成するように構成されており、かつ前記TRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

前記TRAC遺伝子座の前記領域が、配列番号6509～6548又は6805のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

40

## 【請求項 8】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクLEASEである、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記RNAガイドエンドヌクLEASEが、HNHドメインを更に含む、請求項9に記載の方法。

50

## 【請求項 1 1】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6469～6508又は6804のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記TRAC遺伝子座の前記領域が、配列番号6517、6520、及び6523のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

細胞におけるヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPRT）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記HPRT遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

前記HPRT遺伝子座の前記領域が、配列番号6616～6682のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

## 【請求項 1 4】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6549～6615のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

前記HPRT遺伝子座の前記領域が、配列番号6619、6634、6673、6675、及び6679のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項13に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

細胞におけるT細胞受容体ベータ定常1又はT細胞受容体ベータ定常2（TRBC1／2）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記TRBC1／2遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

前記TRBC1／2遺伝子座の前記領域が、配列番号6722～6760又は6782～6802のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

## 【請求項 2 0】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである、請求項19に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 21】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIIDメインを含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHDメインを更に含む、請求項21に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6683～6721及び6761～6781のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項19に記載の方法。

10

## 【請求項 24】

前記TRBC1／2遺伝子座の前記領域が、配列番号6734、6753、6790、及び6800のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項19に記載の方法。

## 【請求項 25】

細胞におけるヒドロキシ酸オキシダーゼ1（HAO1）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記HAO1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含む、

20

前記HAO1遺伝子座の前記領域が、配列番号11802～11820のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

## 【請求項 26】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項25に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIIDメインを含む、請求項25に記載の方法。

30

## 【請求項 28】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHDメインを更に含む、請求項27に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記HAO1遺伝子座の前記領域が、配列番号11806、11813、11816、及び11819のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項25に記載の方法。

40

## 【請求項 30】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼと、

（b）操作されたガイドRNAであって、

（i）2'-O-メチルヌクレオチド、

（ii）2'-フルオロヌクレオチド、又は

（iii）ホスホロチオエート結合を含む、操作されたガイドRNAと、を含み、

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421～431のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する、操作されたヌクレアーゼ系。

50

## 【請求項 3 1】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 4 2 1 と少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 0 に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

## 【請求項 3 2】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

(a) 配列番号 4 2 1 ~ 4 3 1 のうちのいずれか 1 つ又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 % の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA と、を含み、

前記系が、Cas9 酵素を含む同等の系と比較して、ヒト対象に投与されたときに低減された免疫原性を有する、操作されたヌクレアーゼ系。

## 【請求項 3 3】

前記 Cas9 酵素が、SpCas9 酵素である、請求項 3 2 に記載の系。

## 【請求項 3 4】

前記免疫原性が、抗体免疫原性である、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の系。

## 【請求項 3 5】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 5 4 6 6 ~ 5 4 6 7 及び 1 1 1 6 0 ~ 1 1 1 6 2 のうちのいずれか 1 つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の系。

## 【請求項 3 6】

前記操作されたヌクレアーゼが、配列番号 4 2 1 又は 4 2 3 のうちのいずれか 1 つ又はそのバリエーションと、少なくとも約 7 5 % の配列同一性、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の系。

## 【請求項 3 7】

細胞における遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ又は前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、

前記細胞が、末梢血単核細胞 (PBMC)、造血幹細胞 (HSC)、又は人工多能性幹細胞 (iPSC) である、方法。

## 【請求項 3 8】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 2 2 4 2、又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む RuvCII ドメインを含む、請求項 3 7 又は 3 8 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、HNH ドメインを更に含む、請求項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 4 2 1 又はそのバリエーションと、少なくとも約 7 5 % の配列同一性、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 6 8 0 4、6 8 0 6、及び 6 8 0 8 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % 配列同一性である配列を含む、請求項 3 7 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼをコードする前記核酸が、配列番号 6 8 0 3、又はそのバリエーションと、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を含む配列を含む、請求項 3 7 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記遺伝子座の前記領域が、配列番号 6 8 0 5、6 8 0 7、及び 6 8 0 9 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 8 個のヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 3 7 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

細胞における CD 2 分子 (CD 2) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 CD 2 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 6 8 5 3 ~ 6 8 9 4 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 1 8 ~ 2 2 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 6 8 1 1 ~ 6 8 5 2 のうちのいずれか 1 つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

## 【請求項 4 6】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ I I Cas エンドヌクレアーゼである、請求項 4 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 47】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242若しくは配列番号2244、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCドメインを含む、請求項45又は46に記載の方法。

## 【請求項 48】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項45～47のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 49】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421～431のうちのいずれか1つと少なくとも約75%の配列同一性を有する配列を含む、請求項45～48のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 50】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項45～49のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 51】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6813、6841、6843～6847、6852、又は6852のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%同一である配列を含む、請求項45～50のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 52】

前記操作されたガイドRNAが、表6Aに列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項51に記載の方法。

## 【請求項 53】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6855、6883、6885～6889、6892、若しくは6984のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項45～52のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 54】

配列番号6811～6852のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子。

40

## 【請求項 55】

表6Aに列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項54に記載の単離されたRNA分子。

## 【請求項 56】

細胞におけるCD5分子(CD5)遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記CD5遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成

50

されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、前記操作されたガイドRNAが、配列番号6959～7022のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466若しくは6895～6958のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

10

【請求項57】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242若しくは配列番号2244、又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvC IIDメインを含む、請求項56又は57に記載の方法。

20

【請求項59】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項56～58のいずれか一項に記載の方法。

【請求項60】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421～431のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、請求項56～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%配列同一性である配列を含む、請求項56～60のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項62】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項56～61のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項63】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号6897、6904、6906、6911、6928、6930、6932、6934、6938、6945、6950、6952、及び6958のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項56～62のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

前記操作されたガイドRNAが、表7Aに列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに

50

列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 6 9 6 1、6 9 6 8、6 9 7 0、6 9 7 5、6 9 9 2、6 9 9 4、6 9 9 6、6 9 9 8、7 0 0 2、7 0 0 9、7 0 1 4、7 0 1 6、及び 7 0 2 2 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 8 個の連続するヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするように構成されている、請求項 5 6 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

配列番号 6 8 9 5 ~ 6 9 5 8 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子。

【請求項 6 7】

表 7 A に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 6 6 に記載の単離された RNA 分子。

【請求項 6 8】

20

細胞における RNA 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) 配列番号 2 2 4 2 若しくは配列番号 2 2 4 4、又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む、RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 RNA 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、前記 RNA 遺伝子座が、細菌 RNA 又は微生物 RNA を含まない、方法。

【請求項 6 9】

前記ガイド RNA が、配列番号 5 4 6 6 又は配列番号 5 5 3 9 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 6 8 に記載の方法。

30

【請求項 7 0】

細胞における Fas 細胞表面死受容体 (FAS) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記ヒト FAS 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7 0 5 7 ~ 7 0 9 0 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 1 8 ~ 2 2 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

40

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7 0 2 3 ~ 7 0 5 6 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

50

## 【請求項 71】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項70に記載の方法。

## 【請求項 72】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項70又は71に記載の方法。

## 【請求項 73】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項70～72のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 74】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項70～73のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 75】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7059、7061、7069、7070、7076、7080、7083、7084、7085、若しくは7088のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項70～74のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 76】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項70～75のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 77】

前記ガイドRNAが、配列番号7025、7027、7035、7036、7042、7046、7049～7051、又は7054のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項70～76のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 78】

前記ガイドRNAが、表8に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項77に記載の方法。

## 【請求項 79】

配列番号7023～7056のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子。

## 【請求項 80】

表8に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項79に記載の単離されたRNA分子。

## 【請求項 81】

細胞におけるプログラムされた細胞死 1 (PD-1) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記ヒトPD-1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、

10

20

30

40

50

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7129～7166のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7091～7128のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

10

【請求項82】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項81又は82に記載の方法。

20

【請求項84】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項81～83のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項81～84のいずれか一項に記載の方法。

【請求項86】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7135、7137、7146、7149、7152、7156、7160、7161、7164、7165、若しくは7166のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項81～85のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項87】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項81～86のいずれか一項に記載の方法。

【請求項88】

前記ガイドRNAが、配列番号7097、7099、7108、7111、7114、7118、7122、7123、7126、7127、又は7128のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項81～87のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項89】

前記ガイドRNAが、表9に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

配列番号7091～7128のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも

50

約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子。

【請求項 91】

表 9 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 79 に記載の単離された RNA 分子。

【請求項 92】

細胞におけるヒト Rosa26 (hRosa26) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 hRosa26 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7199~7230 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、若しくは 100% の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 18~22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7167~7198 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、若しくは 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項 93】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 2242、又はそのバリエーションと、少なくとも 75% の配列同一性を有する配列を含む RuvCII ドメインを含む、請求項 92 又は 93 に記載の方法。

【請求項 95】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、HNH ドメインを更に含む、請求項 92~94 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 96】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 5466 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 92~95 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 97】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7205~7206、7215、7220、7223、若しくは 7225 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項 92~96 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 98】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421、又はそのバリエーションと、少なくとも 75%、80%、又は 90% 同一である配列を含む、請求項 92~97 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 99】

前記ガイドRNAが、配列番号7173、7174、7183、7188、7191、又は7193のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項92～98のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 100】

前記ガイドRNAが、表10に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項99に記載の方法。

## 【請求項 101】

配列番号7167～7198のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子。

10

## 【請求項 102】

表10に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項101に記載の単離されたRNA分子。

## 【請求項 103】

細胞におけるT細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

20

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記TRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7235～7238、7248～7256、7270、若しくは7278～7284のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

30

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7231～7234、7239～7247、7269、若しくは7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

## 【請求項 104】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項103に記載の方法。

## 【請求項 105】

40

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号1512、1756、11711～11713、又はそれらのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項103～104のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 106】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5473、5475、11145、11714、又は11715の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項103～105のいずれか一項に記載の方法。

50

## 【請求項 107】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7235～7238、7248～7256、7270、若しくは7278～7284のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項103～106のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 108】

前記ガイドRNAが、配列番号7231～7234、7239～7244、7269、又は7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項103～107のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 109】

前記操作されたガイドRNAが、表11に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項108に記載の方法。

## 【請求項 110】

配列番号7231～7234、7239～7247、7269、又は7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子。

## 【請求項 111】

表11に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項110に記載の単離されたRNA分子。

## 【請求項 112】

細胞におけるアデノ随伴ウイルス組み込み部位1(AAVS1)遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記AAVS1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7261～7264若しくは7267～7268のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイドRNAが、配列番号7257～7260若しくは7265～7266のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

## 【請求項 113】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである、請求項112に記載の方法。

## 【請求項 114】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号1756若しくは11711、又はそれらのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、

請求項 1 1 2 ～ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 5 4 7 5 又は 1 1 7 1 5 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 1 2 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 7 2 6 1 ～ 7 2 6 3 若しくは 7 2 6 7 ～ 7 2 6 8 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 8 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項 1 1 2 ～ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記ガイド RNA が、配列番号 7 2 5 7 ～ 7 2 6 0 又は 7 2 6 5 ～ 7 2 6 6 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 1 2 ～ 1 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記操作されたガイド RNA が、表 1 2 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

配列番号 7 2 5 7 ～ 7 2 6 0 又は 7 2 6 5 ～ 7 2 6 6 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子。

【請求項 1 2 0】

表 1 2 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 1 1 9 に記載の単離された RNA 分子。

【請求項 1 2 1】

細胞におけるヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 (H A O - 1) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 H A O - 1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含む、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 1 1 7 7 3 ～ 1 1 7 9 3 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 1 8 ～ 2 2 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、方法。

【請求項 1 2 2】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼである、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 2 2 4 2、又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 % の配列同一性を有する配列を含む R u v C I I I ドメインを含む、請求

10

20

30

40

50

項 1 2 1 又は 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項 1 2 1 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 5 4 6 6 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 2 1 ~ 1 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 2 6】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 1 1 7 7 3、1 1 7 8 0、1 1 7 8 6、若しくは 1 1 7 8 7 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 8 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項 1 2 1 ~ 1 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 4 2 1、又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む、請求項 1 2 1 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 2 8】

配列番号 1 1 7 7 3 ~ 1 1 7 9 3 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するスペーサー配列と、

配列番号 5 4 6 6 と少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する足場配列と、を含む、単離された RNA 分子。

30

【請求項 1 2 9】

細胞におけるヒト G タンパク質共役受容体 1 4 6 ( G P R 1 4 6 ) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

( a ) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

( b ) 操作されたガイド RNA であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 G P R 1 4 6 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 1 1 4 0 6 ~ 1 1 4 3 7 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 1 8 ~ 2 2 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

40

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 1 1 3 7 4 ~ 1 1 4 0 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9

50

%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項130】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項129に記載の方法。

【請求項131】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項129又は130に記載の方法。

【請求項132】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項129～131のいずれか一項に記載の方法。

【請求項133】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項129～132のいずれか一項に記載の方法。

【請求項134】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号11425の少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項129～133のいずれか一項に記載の方法。

【請求項135】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項129～134のいずれか一項に記載の方法。

【請求項136】

前記ガイドRNAが、配列番号11393と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項129～135のいずれか一項に記載の方法。

【請求項137】

前記操作されたガイドRNAが、表15に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項129～136に記載の方法。

【請求項138】

配列番号11374～11405のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスペーサー配列を含む、単離されたRNA分子。

【請求項139】

表15に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項138に記載の単離されたRNA分子。

【請求項140】

細胞におけるマウスGタンパク質共役受容体146（GPR146）遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

（b）操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記GPR146遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、

10

20

30

40

50

前記操作されたガイドRNAが、配列番号11473～11507のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイドRNAが、配列番号11438～11472のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

10

【請求項141】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、請求項140に記載の方法。

【請求項142】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、請求項140又は141に記載の方法。

20

【請求項143】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、請求項140～142のいずれか一項に記載の方法。

【請求項144】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、請求項140～143のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項145】

前記操作されたガイドRNAが、配列番号11482、11488、又は11490のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項140～144のいずれか一項に記載の方法。

【請求項146】

前記RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、請求項140～145のいずれか一項に記載の方法。

【請求項147】

前記ガイドRNAが、配列番号11447、11453、又は11455と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、請求項140～146のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項148】

前記操作されたガイドRNAが、表16に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項140～147に記載の方法。

【請求項149】

配列番号11438～11472のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なく

50

とも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有するスパーサー配列を含む、単離された RNA 分子。

【請求項 150】

表 16 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 149 に記載の単離された RNA 分子。

【請求項 151】

細胞における T 細胞受容体アルファ定常 (TRAC) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該 TRAC 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 11516 ~ 11517 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、若しくは 100% の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 18 ~ 22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいはは

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 11514 ~ 11515 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項 152】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである、請求項 151 に記載の方法。

【請求項 153】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 11153 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 151 ~ 152 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 154】

前記操作されたガイド RNA が、配列番号 11516 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項 151 ~ 153 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 155】

前記 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 11716、又はそのバリエーションと、少なくとも 75%、80%、又は 90% 同一である配列を含む、請求項 151 ~ 154 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 156】

前記ガイド RNA が、配列番号 11514 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を含む、請求項 151 ~ 155 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 157】

前記操作されたガイド RNA が、表 17 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 156 に記載の方法。

【請求項 158】

配列番号 1 1 5 1 4 ~ 1 1 5 1 5 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するスパーサー配列を含む、単離された R N A 分子。

【請求項 1 5 9】

表 1 7 に列挙されたガイド R N A のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項 1 5 8 に記載の単離 R N A 分子。

【請求項 1 6 0】

細胞におけるアデノ随伴ウイルス組み込み部位 1 ( A A V S 1 ) 遺伝子座を破壊する方法であって、前記細胞に、

( a ) R N A ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

( b ) 操作されたガイド R N A であって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ前記 A A V S 1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド R N A を、導入することを含み、

前記操作されたガイド R N A が、配列番号 1 1 5 1 1 ~ 1 1 5 1 3 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 1 8 ~ 2 2 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは

前記操作されたガイド R N A が、配列番号 1 1 5 0 8 ~ 1 1 5 1 0 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、若しくは 1 0 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、方法。

【請求項 1 6 1】

前記 R N A ガイドエンドヌクレアーゼが、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼである、請求項 1 6 0 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記操作されたガイド R N A が、配列番号 1 1 7 1 7 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 1 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1 6 0 ~ 1 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記操作されたガイド R N A が、配列番号 1 1 5 1 1 の少なくとも 1 8 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている、請求項 1 6 0 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記 R N A ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 9 1 4、又はそのバリエーションと、少なくとも 7 5 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む、請求項 1 6 0 ~ 1 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記ガイド R N A が、配列番号 1 1 5 0 8 と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 6 0 ~ 1 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記操作されたガイドRNAが、表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項165に記載の方法。

【請求項167】

配列番号11508～11510のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスパーサー配列を含む、単離されたRNA分子。

【請求項168】

表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む、請求項167に記載の単離RNA分子。

【請求項169】

操作されたヌクレアーゼ系であって、

(a) 本明細書に記載されるCasエフェクタータンパク質配列のうちのいずれか、又はそのバリエーションのPIDメインと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、

(b) 操作されたガイドRNAであって、前記エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAと、を含み、

前記操作されたガイドRNAが、本明細書に記載されるsgRNA配列のうちのいずれかの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項170】

本明細書に記載されるCasエフェクターヌクレアーゼのうちのいずれかのRuvC IIDメイン又はHNHドメインと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するRuvC IIDメイン又はHNHドメインを更に含む、請求項169に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項171】

前記エンドヌクレアーゼが、本明細書に記載されるPAM配列のうちのいずれかに対して選択的であるように構成されている、請求項169又は170に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項172】

前記エンドヌクレアーゼが、本明細書に記載されるCasエフェクター配列のうちのいずれかと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を更に含む、請求項169～171のいずれか一項に記載の操作されたヌクレアーゼ系。

【請求項173】

細胞におけるB2M遺伝子座を破壊するための請求項1～6のいずれか一項に記載の方

10

20

30

40

50

法の使用。

【請求項 174】

細胞における T R A C 遺伝子座を破壊するための、請求項 7 ～ 12、103 ～ 109、若しくは 151 ～ 157 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 110 ～ 111 若しくは 158 ～ 159 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 175】

細胞における H P R T 遺伝子座を破壊するための、請求項 13 ～ 18 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 176】

細胞における T R B C 1 / 2 遺伝子座を破壊するための、請求項 19 ～ 24 のいずれか一項に記載の方法の使用。

10

【請求項 177】

細胞における H A O - 1 遺伝子座を破壊するための、請求項 25 ～ 29 若しくは 121 ～ 127 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 128 ～ 129 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 178】

細胞における C D 2 遺伝子座を破壊するための、請求項 45 ～ 53 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 54 ～ 55 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 179】

細胞における C D 5 遺伝子座を破壊するための、請求項 56 ～ 65 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 66 ～ 67 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

20

【請求項 180】

細胞における F A S 遺伝子座を破壊するための、請求項 70 ～ 78 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 79 ～ 80 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 181】

細胞における P D - 1 遺伝子座を破壊するための、請求項 81 ～ 89 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 90 ～ 91 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 182】

細胞における h R o s a 2 6 遺伝子座を破壊するための、請求項 92 ～ 100 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 101 ～ 102 のいずれか一項に記載の R N A、の使用

30

。

【請求項 183】

細胞における A A V S 1 遺伝子座を破壊するための、請求項 112 ～ 118 若しくは 160 ～ 166 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 119 ～ 120 若しくは 167 ～ 168 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【請求項 184】

細胞における G P R 1 4 6 遺伝子座を破壊するための、請求項 129 ～ 137 若しくは 140 ～ 148 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 138 ～ 139 若しくは 149 ～ 150 のいずれか一項に記載の R N A、の使用。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、P C T 出願番号 第 P C T / U S 2 1 / 3 1 1 3 6 号に関連するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

相互参照

本出願は、2021年8月27日に出願された米国仮特許出願第63 / 237, 791号、2021年9月17日に出願された第63 / 245, 629号、2021年10月6日に出願された第63 / 252, 956号、2021年11月24日に出願された第63

50

／ 282, 909号、2022年3月4日に出願された第63／316, 895号、2022年3月14日に出願された第63／319, 681号、2022年3月23日に出願された第63／322, 944号、及び2022年7月29日に出願された第63／369, 858号の利益を主張するものであり、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【背景技術】

##### 【0003】

Cas酵素は、それらの関連するクラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート (CRISPR) ガイドリボ核酸 (RNA) とともに、原核生物の免疫系の広範 (細菌の約45%、古細菌の約84%) な成分であるようであり、CRISPR-RNAガイド核酸切断による感染性ウイルス及びプラスミドなどの非自己核酸からこうした微生物を保護するのに役立つ。CRISPR RNAエレメントをコードするデオキシリボ核酸 (DNA) エレメントは、構造及び長さが比較的保存され得るが、それらのCRISPR関連 (Cas) タンパク質は、高度に多様であり、非常に様々な核酸相互作用ドメインを含む。CRISPR DNAエレメントは、早くも1987年に観察されているが、CRISPR/Cas複合体のプログラム可能なエンドヌクレアーゼ切断能力は、比較的最近でしか認識されておらず、多様なDNA操作及び遺伝子編集用途における組換えCRISPR/Cas系の使用につながっている。

##### 【0004】

#### 配列表

本出願は、XML形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2022年8月26日に作成された当該XMLコピーは、55921-731\_\_601\_\_SL.xmlと名付けられ、23, 191, 225バイトのサイズである。

#### 【発明の概要】

##### 【0005】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるベーター2-ミクログロブリン (B2M) 遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、B2M遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、B2M遺伝子座の領域は、配列番号6387~6468のいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6305~6386のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、B2M遺伝子座の領域は、配列番号6388、6399、6401、6403、6410、6413、6421、6446、及び6448のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

##### 【0006】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるT細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、TRAC遺伝子座の領域は、配列番号6509～6548又は6805のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6469～6508又は6804のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子座の領域は、配列番号6517、6520、及び6523のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

10

20

30

40

50

【0007】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPR T）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHPR T遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、HPR T遺伝子座の領域は、配列番号6616～6682のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6549～6615のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、HPR T遺伝子座の領域は、配列番号6619、6634、6673、6675、及び6679のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

## 【0008】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるT細胞受容体ベータ定常1又はT細胞受容体ベータ定常2（TRBC1／2）遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRBC1／2遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、TRBC1／2遺伝子座の領域は、配列番号6722～6760又は6782～6802のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6683～6721及び6761～6781のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、TRBC1／2遺伝子座の領域は、配列番号6734、6753、6790、及び6800のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

## 【0009】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒドロキシ酸オキシダーゼ1（HAO1）遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつHAO1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、HAO1遺伝子座の領域は、配列番号11802～11820のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、HAO1遺伝子座の領域が、配列番号11806、11813、11816、及び11819のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

## 【0010】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼと、（b）操作されたガイドRNAであって、（i）2'-O-

メチルヌクレオチド、(ii) 2'-フルオロヌクレオチド、又は(iii) ホスホロチオエート結合を含む操作されたガイドRNAと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供し、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

10

#### 【0011】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 配列番号421~431のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供し、この系は、Cas9酵素を含む同等の系と比較して、ヒト対象に投与されたときに低減された免疫原性を有する。いくつかの実施形態では、Cas9酵素は、SpCas9酵素である。いくつかの実施形態では、免疫原性は、抗体免疫原性である。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5466~5467及び11160~11162のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼは、配列番号421又は423のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも約75%の配列同一性、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する。

20

30

#### 【0012】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、又はRNAガイドエンドヌクレアーゼをコードする核酸、(b) 操作されたガイドRNAであって、RNAガイドエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、細胞は末梢血単核細胞(PBMC)であり、造血幹細胞(HSC)、又は人口多能性幹細胞(iPSC)である。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvC

40

50

IIIDメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421又はそのバリエーションと、少なくとも約75%の配列同一性、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6804、6806、及び6808のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%配列同一性である配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6803、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子座の領域が、配列番号6805、6807、及び6809のうちのいずれか1つの少なくとも18個のヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0013】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるCD2分子(CD2)遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b) 操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつCD2遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号6853~6894のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18~22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号6811~6852のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242若しくは配列番号2244、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIIDメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93

%、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421、又はそのバリエーションと、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 6813、6841、6843 ~ 6847、6852、又は 6852 のうちのいずれか 1 つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、又は少なくとも約 99 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 6A に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 6855、6883、6885 ~ 6889、6892、若しくは 6984 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。

10

20

#### 【0014】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 6811 ~ 6852 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、表 6A に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0015】

いくつかの態様では、本開示は CD5 分子 (CD5) 遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ CD5 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 6959 ~ 7022 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 18 ~ 22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイド RNA は、配列番号 5466 若しくは 6895 ~ 6958 のうちのいずれか 1 つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242 若しくは配列番号 2244、又はそのバリエーションと、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約

30

40

50

91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つ又はそのバリエーションと、少なくとも75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6897、6904、6906、6911、6928、6930、6932、6934、6938、6945、6950、6952、及び6958のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表7Aに列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号6961、6968、6970、6975、6992、6994、6996、6998、7002、7009、7014、7016、及び7022のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列にハイブリダイズするように構成されている

10

20

30

40

50

#### 【0016】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号6895~6958のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA分子は、表7Aに列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0017】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるRNA遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、細胞に、(a)配列番号2242若しくは配列番号2244、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、RNAガイ

ドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつRNA遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、RNA遺伝子座は、細菌RNA又は微生物RNAを含まない。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号5466又は配列番号5539の非縮重ヌクレオチドと少なくとも80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。

【0018】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるFas細胞表面死受容体（FAS）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつヒトFAS遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号7057～7090のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号7023～7056のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvcIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号7059、7061、7069、7070、7076、7080、7083、7084、7085、若しくは7088のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号7025、7027、7035、7036、7042、7046、7049～7051、又は7054のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、表8に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0019】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 7023～7056 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、表 8 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0020】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるプログラムされた細胞死 1 (PD-1) 遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつヒト PD-1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 7129～7166 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 18～22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイド RNA は、配列番号 7091～7128 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む RuvC II ドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、HNH ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 5466 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 7135、7137、7146、7149、7152、7156、7160、7161、7164、7165、若しくは 7166 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421、又はそのバリエーションと、少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 7097、7099、7108、7111、7114、7118、7122、7123、7126、7127、又は 7128 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、表 9 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0021】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 7091～7128 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、

10

20

30

40

50

少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、表 9 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0022】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒト Rosa26 (hRosa26) 遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ hRosa26 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 7199~7230 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、若しくは 100% の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも 18~22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイド RNA は、配列番号 7167~7198 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、若しくは 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む RuvCII ドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、HNH ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 5466 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 7205~7206、7215、7220、7223、若しくは 7225 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80% の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421、又はそのバリエーションと、少なくとも 75%、80%、又は 90% 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 7173、7174、7183、7188、7191、又は 7193 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、表 10 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

#### 【0023】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 7167~7198 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、RNA分子は、表10に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0024】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるT細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号7235～7238、7248～7256、7270、若しくは7278～7284のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号7231～7234、7239～7247、7269、若しくは7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号1512、1756、11711～11713、又はそれらのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5473、5475、11145、11714、又は11715の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号7235～7238、7248～7256、7270、若しくは7278～7284のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号7231～7234、7239～7244、7269、又は7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表11に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0025】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号7231～7234、7239～7247、7269、又は7271～7277のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む、単離されたRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA分子は、表11に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0026】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるアデノ随伴ウイルス組み込み部位1（AVS1）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）クラス2、タイプ

10

20

30

40

50

II Cas エンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ AAVS1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 7261~7264 若しくは 7267~7268 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 18~22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイド RNA は、配列番号 7257~7260 若しくは 7265~7266 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 1756 若しくは 11711、又はそれらのバリエーションと、少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 5475 又は 11715 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 7261~7263 若しくは 7267~7268 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 7257~7260 又は 7265~7266 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 12 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

10

20

30

【0027】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 7257~7260 又は 7265~7266 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、表 12 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0028】

40

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒドロキシ酸オキシダーゼ 1 (HAO-1) 遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ HAO-1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 11773~11793 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 18~22 個

50

の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11773、11780、11786、若しくは11787のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。

【0029】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号11773～11793のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスペーサー配列と、配列番号5466と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する足場配列と、を含む、単離されたRNA分子を提供する。

【0030】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるヒトGタンパク質共役受容体146（GPR146）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び、（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつGPR146遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号11406～11437のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号11374～11405のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91

%、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む R u v C I I I ドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、HNH ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 5466 の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、配列番号 11425 の少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421、又はそのバリエーションと、少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 11393 と少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド RNA は、表 15 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

10

#### 【0031】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号 11374 ~ 11405 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有するスペーサー配列を含む、単離された RNA 分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA 分子は、表 15 に列挙されたガイド RNA のうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

20

#### 【0032】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるマウス G タンパク質共役受容体 146 (GPR146) 遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び、(b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ GPR146 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、導入することを含み、操作されたガイド RNA は、配列番号 11473 ~ 11507 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも 18 ~ 22 個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイド RNA は、配列番号 11438 ~ 11472 のうちのいずれか 1 つと少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、若しくは 100 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242、又はそのバリエーションと、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、少なくとも約 94 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する配列を含む R u v C I I I ドメインを含む。いくつかの実施形態では、RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、HNH ドメインを更に含む

30

40

50

。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号5466の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11482、11488、若しくは11490のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号11447、11453、又は11455と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表16に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

10

#### 【0033】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号11438～11472のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスパーサー配列を含む、単離されたRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA分子は、表16に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

20

#### 【0034】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるT細胞受容体アルファ定常（TRAC）遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつTRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号11516～11517のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列に相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号11514～11515のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11153の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11516のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号11716、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施

30

40

50

形態では、ガイドRNAは、配列番号11514と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

【0035】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号11514～11515のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスペーサー配列を含む、単離されたRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA分子は、表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

10

【0036】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるアデノ随伴ウイルス組み込み部位1(AVS1)遺伝子座を破壊する方法を提供し、方法は、細胞に、(a)RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b)操作されたガイドRNAであって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつAVS1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、導入することを含み、操作されたガイドRNAは、配列番号11511～11513のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有する配列と相補的である少なくとも18～22個の連続するヌクレオチドを有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されているか、あるいは操作されたガイドRNAは、配列番号11508～11510のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、若しくは100%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11717の非縮重ヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、配列番号11511の少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の同一性を有する配列を含むか、又はそれにハイブリダイズするように構成されている。いくつかの実施形態では、RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号914、又はそのバリエーションと、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号11508と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイドRNAは、表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

20

30

40

【0037】

いくつかの態様では、本開示は、配列番号11508～11510のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は100%の配列同一性を有するスペーサー配列を含む、単離されたRNA分子を提供する。いくつかの実施形態では、RNA分子は、表17に列挙されたガイドRNAのうちのいずれかに列挙されたヌクレオチド修飾のパターンを更に含む。

50

## 【0038】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 本明細書に記載される Cas エフェクタータンパク質配列のうちのいずれかの P1ドメイン、又はそのバリエーションと、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼと、(b) 操作されたガイド RNA であって、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ標的核酸配列にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供し、操作されたガイド RNA は、本明細書に記載される sgRNA 配列のうちのいずれかの非縮重ヌクレオチドと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、本明細書に記載される Cas エフェクターヌクレアーゼのうちのいずれかの RuvCII ドメイン又は HNH ドメインと、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する RuvCII ドメイン又は HNH ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される PAM 配列のうちのいずれかについての選択性を有するように構成されている。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、本明細書に記載される Cas エフェクター配列のうちのいずれかと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、又は 100% の配列同一性を有する配列を更に含む。

## 【0039】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における B2M 遺伝子座を破壊するための本明細書に記載される方法のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0040】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における TRAC 遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載される RNA 分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0041】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における HPR1 遺伝子座を破壊するための本明細書に記載される方法のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0042】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における TRBC1/2 遺伝子座を破壊するための本明細書に記載される方法のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0043】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における HAO-1 遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載される RNA 分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0044】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における CD2 遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載される RNA 分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0045】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるCD5遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0046】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるFAS遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0047】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるPD-1遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

10

## 【0048】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるhRosa26遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0049】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるAAVS1遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

20

## 【0050】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるGPR146遺伝子座を破壊するための、本明細書に記載される方法のうちのいずれか、又は本明細書に記載されるRNA分子のうちのいずれかの使用を提供する。

## 【0051】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) RuvC\_\_IIIDメイン及びHNHDメインを含むエンドヌクレアーゼであって、未培養微生物に由来し、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、エンドヌクレアーゼと、(b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造であって、(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているガイドリボ核酸配列、及び(ii) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されたtracrリボ核酸配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、RuvC\_\_IIIDメインは、配列番号1827～3637のうちのいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含む。

30

## 【0052】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 配列番号1827～3637のうちのいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するRuvC\_\_IIIDメインを含むエンドヌクレアーゼと、(b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造であって、(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているガイドリボ核酸配列、及び(ii) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されているtracrリボ核酸配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。

40

## 【0053】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 配列番号5512～5537を含むプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に結合するよう

50

に構成されているエンドヌクレアーゼであって、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、エンドヌクレアーゼと、(b) エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造であって、(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているガイドリボ核酸配列、及び(ii) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されている tracrRNA 配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、未培養の微生物に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、異なる PAM 配列に結合するよう操作されていない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Cas9 エンドヌクレアーゼ、Cas14 エンドヌクレアーゼ、Cas12a エンドヌクレアーゼ、Cas12b エンドヌクレアーゼ、Cas12c エンドヌクレアーゼ、Cas12d エンドヌクレアーゼ、Cas12e エンドヌクレアーゼ、Cas13a エンドヌクレアーゼ、Cas13b エンドヌクレアーゼ、Cas13c エンドヌクレアーゼ、又は Cas13d エンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、Cas9 エンドヌクレアーゼと80%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、tracrRNA 配列は、配列番号5476~5511及び配列番号5538のうちのいずれか1つから選択される約60~90個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。

#### 【0055】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) (i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているガイドリボ核酸配列、及び(ii) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されている tracrRNA 配列であって、配列番号5476~5511及び配列番号5538のうちのいずれか1つから選択される約60~90個の連続するヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、tracrRNA 配列、を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、(b) 操作されたガイドリボ核酸に結合するように構成されたクラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5512~5537を含む群から選択されるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に結合するように構成されている。

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、操作されたガイドリボ核酸構造は、少なくとも2つのリボ核酸ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、操作されたガイド核酸構造は、ガイドリボ核酸配列及び tracrRNA 配列を含む1つのリボ核酸ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0057】

いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、原核生物、細菌、古細菌、真核生物、真菌、植物、哺乳類、又はヒトゲノム配列に相補的である。いくつかの実施形態では、ガイドリボ核酸配列は、15~24ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼのN末端又はC末端の近位に1つ以上の核局在化配列(NLS)を含む。いくつかの実施形態では、NLSは、配列番号5597~5612から選択される配列を含む。

#### 【0058】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系は、5'から3'の方向に：標的デオキシリボ核酸配列に対して5'側に少なくとも20ヌクレオチドの配列を含む第1の相同アーム、少なくとも10ヌクレオチドの合成DNA配列、及び標的配列に対して3'側に少なくとも20ヌクレオチドの配列を含む第2の相同アーム、を含む一本鎖又は二本鎖DNA修復鋳型を更に含む。いくつかの実施形態では、第1又は第2の相同アームは、少なくとも40、80、120、150、200、300、500、又は1,000ヌクレ

オチドの配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、系は、 $Mg^{2+}$ の供給源を更に含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼ及びtracrリボ核酸配列は、同じ門内の別個の細菌種に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、*Derma bacter*属に属する細菌に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、*Verrucomicrobia*門、*Candidatus Peregrinibacteria*門、又は*Candidatus Melainabacteria*門に属する細菌に由来する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5592-5595のうちのいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する16S rRNA遺伝子を含む細菌に由来する。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、HNHDメインは、配列番号5638-5460のうちのいずれか1つと少なくとも70%又は少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号1-1826、又はそれと少なくとも55%の同一性を有するそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号1827-1830又は配列番号1827-2140からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。

20

【0062】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号3638-3641又は配列番号3638-3954からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5615-5632からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号1-4又は配列番号1-319からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5461-5464、配列番号5476-5479又は配列番号5476-5489からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、ステム及びループからなるヘアピンを含むと予測されるRNA配列を含み、ステムは、少なくとも10、少なくとも12、又は少なくとも14塩基対リボヌクレオチド、及びループの4塩基対以内に非対称バルジを含む。

30

【0064】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5512-5515又は配列番号5527-5530からなる群から選択される配列を含むPAMに結合するように構成されている。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号1827と少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5461又は配列番号5476のうちの少なくとも1つと少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5512又は配列番号5527を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号1828と少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5462又は配列番号5477のうちの少なくとも1つと少なくとも70%、少なくとも80%、又は少なくとも90%同一であ

50

る配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 1 3 又は配列番号 5 5 2 8 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 8 2 9 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 6 3 又は配列番号 5 4 7 8 のうちの少なくとも 1 つと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 1 4 又は配列番号 5 5 2 9 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 8 3 0 と少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 6 4 又は配列番号 5 4 7 9 のうちの少なくとも 1 つと少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、又は少なくとも 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 1 5 又は配列番号 5 5 3 0 を含む P A M に結合するように構成されている。

10

#### 【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 2 1 4 1 ~ 2 1 4 2 又は配列番号 2 1 4 1 ~ 2 2 4 1 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 9 5 5 ~ 3 9 5 6 又は配列番号 3 9 5 5 ~ 4 0 5 5 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 6 3 2 ~ 5 6 3 8 からなる群から選択される少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、又は少なくとも 5 個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 2 0 ~ 3 2 1 又は配列番号 3 2 0 ~ 4 2 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 6 5、配列番号 5 4 9 0 ~ 5 4 9 1、又は配列番号 5 4 9 0 ~ 5 4 9 4 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド R N A 構造は、少なくとも 8 個、少なくとも 1 0 個、又は少なくとも 1 2 個の塩基対リボヌクレオチドを含むヘアピンを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 1 6 及び配列番号 5 5 3 1 からなる群から選択される配列を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 2 1 4 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 9 0 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 3 1 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 2 1 4 2 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 6 5 又は配列番号 5 4 9 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 1 6 を含む P A M に結合するように構成されている。

20

30

#### 【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 2 2 4 5 ~ 2 2 4 6 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 4 0 5 9 ~ 4 0 6 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 6 3 9 ~ 5 6 4 8 からなる群から選択される少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、又は少なくとも 5 個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 4 2 4 ~ 4 2 5 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド R N A 構造は、配列番号 5 4 9 8 ~ 5 4 9 9 及び配列番号 5 5 3 9 からなる群から選択される配列

40

50

と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、ガイドリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチド及びtracrリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチドを含む、中断されていない塩基対領域を有するヘアピンを含むと予測されるガイドリボ核酸配列を含み、tracrリボ核酸配列は、5'から3'の方向に、第1のヘアピン及び第2のヘアピンを含み、第1のヘアピンは、第2のヘアピンよりも長いステムを有する。

#### 【0068】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2242~2244又は配列番号2247~2249からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4058及び配列番号4061~4063からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5639~5648からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号421~423又は配列番号426~428からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5466~5467、配列番号5495~5497、配列番号5500~5502、及び配列番号5539からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、ガイドリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチド及びtracrリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチドを含む、中断されていない塩基対領域を有するヘアピンを含むと予測されるガイドリボ核酸配列を含み、tracrリボ核酸配列は、5'から3'の方向に、第1のヘアピン及び第2のヘアピンを含み、第1のヘアピンは、第2のヘアピンよりも長いステムを有する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5517~5518又は配列番号5532~5534からなる群から選択される配列を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号2247と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5500と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5517又は配列番号5532を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号2248と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5501と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5518又は配列番号5533を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号2249と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5502と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5534を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0069】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2253又は配列番号2253~2481からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4067又は配列番号4067~4295からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5649によるペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号432又は配列番号432~660からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5468又は配列番号5503からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いく

つかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5519からなる群から選択される配列を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号2253と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5468又は配列番号5503と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5519を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0070】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2482~2489からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4296~4303からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号661~668からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2490~2498からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4304~4312からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号669~677からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5504からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。

#### 【0071】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2499又は配列番号2499~2750からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4313又は配列番号4313~4564からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5650~5667からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号678又は配列番号678~929からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5469又は配列番号5505と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5520又は5535を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号2499と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b) ガイドRNA構造は、配列番号5469又は配列番号5505と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5520又は配列番号5535を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0072】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2751又は配列番号2751~2913からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4565又は配列番号4565~4727からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5668~5678からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号930又は配列番号930~1092からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号547

0又は配列番号5506と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5521又は配列番号5536からなる群から選択される配列を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a)エンドヌクレアーゼは、配列番号2751と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b)ガイドRNA構造は、配列番号5470又は配列番号5506と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c)エンドヌクレアーゼは、配列番号5521又は配列番号5536を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0073】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2914又は配列番号2914~3174からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4728又は配列番号4728~4988からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5676~5678からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、又は少なくとも3個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号1093又は配列番号1093~1353からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5471、配列番号5507、及び配列番号5540~5542からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、5塩基対未満のリボヌクレオチドを含む少なくとも2つのヘアピンを含むと予測されるtracrRリボ核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5522を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a)エンドヌクレアーゼは、配列番号2914と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b)ガイドRNA構造は、配列番号5471又は配列番号5507と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c)エンドヌクレアーゼは、配列番号5522を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号3175又は配列番号3175~3330からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4989又は配列番号4989~5146からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5679~5686からなる群から選択される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、又は少なくとも5個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号1354又は配列番号1354~1511からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA構造は、配列番号5472又は配列番号5508からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5523又は配列番号5537からなる群から選択される配列を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a)エンドヌクレアーゼは、配列番号3175と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(b)ガイドRNA構造は、配列番号5472又は配列番号5508と少なくとも70%、80%、又は90%同一である配列を含み、(c)エンドヌクレアーゼは、配列番号5523又は配列番号5537を含むPAMに結合するように構成されている。

#### 【0075】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号3331又は配列番号3331~3474からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、又は90%

同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 1 4 7 又は配列番号 5 1 4 7 ~ 5 2 9 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 6 7 4 ~ 5 6 7 5 及び配列番号 5 6 8 7 ~ 5 6 9 3 からなる群から選択される少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、又は少なくとも 5 個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 5 1 2 又は配列番号 1 5 1 2 ~ 1 6 5 5 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 3 又は配列番号 5 5 0 9 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 4 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 3 3 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 3 又は配列番号 5 5 0 9 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 4 を含む P A M に結合するように構成されている。

10

#### 【0076】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 4 7 5 又は配列番号 3 4 7 5 ~ 3 5 6 8 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 2 9 1 又は配列番号 5 2 9 1 ~ 5 3 8 9 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 6 9 4 ~ 5 6 9 9 からなる群から選択される少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、又は少なくとも 5 個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 6 5 6 又は配列番号 1 6 5 6 ~ 1 7 5 5 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 4 又は配列番号 5 5 1 0 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 5 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 4 7 5 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 4 又は配列番号 5 5 1 0 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 5 を含む P A M に結合するように構成されている。

20

30

#### 【0077】

いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 5 6 9 又は配列番号 3 5 6 9 ~ 3 6 3 7 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 3 9 0 又は配列番号 5 3 9 0 ~ 5 4 6 0 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 7 0 0 ~ 5 7 1 7 からなる群から選択される少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、又は少なくとも 5 個のペプチドモチーフを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 1 7 5 6 又は配列番号 1 7 5 6 ~ 1 8 2 6 からなる群から選択される配列と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 5 又は配列番号 5 5 1 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号 5 5 2 6 を含む P A M に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、(a) エンドヌクレアーゼは、配列番号 3 5 6 9 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、又は 9 0 % 同一である配列を含み、(b) ガイド RNA 構造は、配列番号 5 4 7 5 又は配列番号 5 5 1 1 と少なくとも 7 0 %

40

50

、80%、又は90%同一である配列を含み、(c) エンドヌクレアーゼは、配列番号5526を含むPAMに結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、配列同一性は、BLASTP、CLUSTALW、MUSCLE、MAFFT、又はSmith-Waterman 相同性検索アルゴリズムのパラメーターを用いるCLUSTALWによって決定される。いくつかの実施形態では、配列同一性は、3のワード長(W)、10の期待値(E)のパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用する、BLASTP 相同性検索アルゴリズムによって決定される。

#### 【0078】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 標的DNA分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むDNA 標的化セグメントと、(b) ハイブリダイズして二本鎖RNA (dsRNA) 二重鎖を形成するヌクレオチドの2つの相補的なストレッチを含むタンパク質結合セグメントと、を含む、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドを提供し、ヌクレオチドの2つの相補的なストレッチは、介在するヌクレオチドと互いに共有結合しており、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、配列番号1827~3637のうちのいずれか1つと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するRuvC—IIDドメインを含むエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつその複合体を標的DNA分子の標的配列に標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、DNA 標的化セグメントは、ヌクレオチドの2つの相補的なストレッチの両方の5'に位置付けられる。

#### 【0079】

いくつかの実施形態では、(a) タンパク質結合セグメントは、配列番号5476~5479若しくは配列番号5476~5489からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、若しくは少なくとも98%の同一性を有する配列を含み、(b) タンパク質結合セグメントは、(配列番号5490~5491若しくは配列番号5490~5494) 及び配列番号5538からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(c) タンパク質結合セグメントは、配列番号5498~5499からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(d) タンパク質結合セグメントは、配列番号5495~5497及び配列番号5500~5502からなる群から選択される配列と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(e) タンパク質結合セグメントは、配列番号5503と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(f) タンパク質結合セグメントは、配列番号5504と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(g) タンパク質結合セグメントは、配列番号5505と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(h) タンパク質結合セグメントは、配列番号5506と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(i) タンパク質結合セグメントは、配列番号5507と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(j) タンパク質結合セグメントは、配列番号5508と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(k) タンパク質結合セグメントは、配列番号5509と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、(l) タンパク質結合セグメントは、配列番号5510と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含み、又は(m) タンパク質結合セグメントは、配列番号5511と少なくとも70%、少なくとも80%、若しくは少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。

## 【0080】

いくつかの実施形態では、(a) ガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、ステム及びループを含むヘアピンを含むRNA配列を含み、ステムは少なくとも10、少なくとも12、若しくは少なくとも14塩基対のリボヌクレオチドと、ループの4塩基対以内の非対称バルジを含むか、(b) ガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、少なくとも8、少なくとも10、若しくは少なくとも12塩基対のリボヌクレオチドを含むヘアピンを含むと予測されるtracrリボ核酸配列を含むか、(c) ガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、ガイドリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチド及びtracrリボ核酸配列の少なくとも8ヌクレオチドを含む、中断されない塩基対領域を有するヘアピンを含むと予測されるガイドリボ核酸配列を含み、tracrリボ核酸配列が、5'から3'の方向に、第1のヘアピン及び第2のヘアピンを含み、第1のヘアピンが、第2のヘアピンよりも長いステムを有するか、又は(d) ガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、5塩基対未満のリボヌクレオチドを含む少なくとも2つのヘアピンを含むと予測されるtracrリボ核酸配列を含む。

## 【0081】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドのうちのいずれかをコードするデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを提供する。

## 【0082】

いくつかの態様では、本開示は、生物における発現に最適化された操作された核酸配列を含む核酸を提供し、核酸は、Ruvc\_\_IIIDメイン及びHNHDメインを含むクラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼをコードし、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。

## 【0083】

いくつかの態様では、本開示は、生物における発現に最適化された操作された核酸配列を含む核酸を提供し、核酸は、配列番号1827～3637のうちのいずれか1つと少なくとも70%の配列同一性を有するRuvc\_\_IIIDメインを含むエンドヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号3638～5460のうちのいずれか1つと少なくとも70%又は少なくとも80%の配列同一性を有するHNHDメインを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5572～5591、又はそれと少なくとも70%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼのN末端又はC末端の近位に1つ以上の核局在化配列(NLS)をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、NLSは、配列番号5597～5612から選択される配列を含む。

## 【0084】

いくつかの実施形態では、生物は、原核生物、細菌、真核生物、真菌、植物、哺乳類、齧歯類、又はヒトである。いくつかの実施形態では、生物は、E. coliであり、(a) 核酸配列は、配列番号5572～5575からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(b) 核酸配列は、配列番号5576～5577からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(c) 核酸配列は、配列番号5578～5580からなる群から選択される配列と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(d) 核酸配列は、配列番号5581と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(e) 核酸配列は、配列番号5582と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(f) 核酸配列は、配列番号5583と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(g) 核酸配列は、配列番号5584と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(h) 核酸配列は、配列番号5585と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、(i) 核酸配列は、配列番号5586と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有し、又は(j) 核酸配列は、配列番号5587と少なくとも70%、80%、若しくは90%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、生物はヒトであり、(a) 核酸配列は、配列番号5588若しくは

配列番号 5 5 8 9 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、若しくは 9 0 % の同一性を有するか、又は (b) 核酸配列は、配列番号 5 5 9 0 若しくは配列番号 5 5 9 1 と少なくとも 7 0 %、8 0 %、若しくは 9 0 % の同一性を有する。

【0085】

いくつかの態様では、本開示は、RuvC\_\_IIドメイン及びHNHドメインを含むクラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼをコードする核酸配列を含む操作されたベクターを提供し、エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。

【0086】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちのいずれかを含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、(a) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているガイドリボ核酸配列と、(b) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されている tracr ンリボ核酸配列とを含む、エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造をコードする核酸を更に含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、CELiD、アデノ随伴ウイルス(AAV)由来ビリオン、又はレンチウイルスである。

【0087】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかを含む細胞を提供する。

【0088】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される細胞のうちのいずれかを培養することを含む、エンドヌクレアーゼを製造する方法を提供する。

【0089】

いくつかの態様では、本開示は、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを結合するか、切断するか、マーキングするか、又は修飾する方法を提供し、方法は、(a) 二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを、エンドヌクレアーゼ及び二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合するように構成されている操作されたガイド核酸構造との複合体におけるクラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと接触させることを含み、(b) 二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を含み、(c) PAMは、配列番号5512~5526又は配列番号5527~5537からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、操作されたガイドリボ核酸構造の配列と相補的である配列を含む第1の鎖と、PAMを含む第2の鎖とを含む。いくつかの実施形態では、PAMは、操作されたガイドリボ核酸構造の配列と相補的である配列の3'末端に直接隣接する。

【0090】

いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas9 エンドヌクレアーゼ、Cas14 エンドヌクレアーゼ、Cas12a エンドヌクレアーゼ、Cas12b エンドヌクレアーゼ、Cas12c エンドヌクレアーゼ、Cas12d エンドヌクレアーゼ、Cas12e エンドヌクレアーゼ、Cas13a エンドヌクレアーゼ、Cas13b エンドヌクレアーゼ、Cas13c エンドヌクレアーゼ、又はCas13d エンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。いくつかの実施形態では、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、真核生物、植物、真菌、哺乳類、齧歯類、又はヒト二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドである。

【0091】

いくつかの実施形態では、(a) PAMは、配列番号5512~5515及び配列番号5527~5530からなる群から選択される配列を含み、(b) PAMは、配列番号5516若しくは配列番号5531を含み、(c) PAMは、配列番号5539を含み、(d) PAMは、配列番号5517若しくは配列番号5518を含み、(e) PAMは、配列番号5519を含み、(f) PAMは、配列番号5520若しくは配列番号5535を

含み、(g) PAMは、配列番号5521若しくは配列番号5536を含み、(h) PAMは、配列番号5522を含み、(i) PAMは、配列番号5523若しくは配列番号5537を含み、(j) PAMは、配列番号5524を含み、(k) PAMは、配列番号5525を含み、又は(l) PAMは、配列番号5526を含む。

【0092】

いくつかの態様では、本開示は、標的核酸遺伝子座を修飾する方法を提供し、方法は、本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系のうちのいずれかを標的核酸遺伝子座に送達することを含み、エンドヌクレアーゼは、操作されたガイドリボ核酸構造と複合体を形成するように構成されており、複合体は、複合体が標的核酸遺伝子座に結合すると、複合体が標的核酸遺伝子座を修飾するように構成されている。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座を修飾することは、標的核酸遺伝子座を結合、ニックング、切断、又はマーキングすることを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座は、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、ゲノムDNA、ウイルスDNA、ウイルスRNA、又は細菌DNAを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座は、インビトロである。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座は、細胞内にある。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞、細菌細胞、真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、齧歯類細胞、霊長類細胞、又はヒト細胞である。

【0093】

いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、本明細書に記載される核酸のうちのいずれか又は本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかを送達することを含む。いくつかの実施形態では、操作されたヌクレアーゼ系を標的核酸遺伝子座に送達することは、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を送達することを含む。いくつかの実施形態では、核酸は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームが作動可能に連結されているプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座への操作されたヌクレアーゼ系は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含むキャッピングされたmRNAを送達することを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座への操作されたヌクレアーゼ系は、翻訳されたポリペプチドを送達することを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸遺伝子座への操作されたヌクレアーゼ系は、リボ核酸(RNA) pol IIIプロモーターに作動可能に連結された操作されたガイドリボ核酸をコードするデオキシリボ核酸(DNA)を送達することを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子座で、又は標的遺伝子座の近位で、一本鎖切断又は二本鎖切断を誘導する。

【0094】

いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 配列番号5718~5846又は6257のうちのいずれか1つと75%の配列同一性を有する配列を含むエンドヌクレアーゼと、(b) 当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造であって、(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているリボ核酸配列、及び(ii) 当該エンドヌクレアーゼに結合するように構成されているリボ核酸配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a) 配列番号5847~5861又は6258~6278を含むプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に結合するように構成されているエンドヌクレアーゼであって、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、エンドヌクレアーゼと、(b) 当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造であって、(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているリボ核酸配列、及び(ii) 当該エンドヌクレアーゼに結合するように構成されているリボ核酸配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施

形態では、当該エンドヌクレアーゼは、未培養微生物に由来する。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、異なるPAM配列に結合するよう操作されていない。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼ、Cas14エンドヌクレアーゼ、Cas12aエンドヌクレアーゼ、Cas12bエンドヌクレアーゼ、Cas12cエンドヌクレアーゼ、Cas12dエンドヌクレアーゼ、Cas12eエンドヌクレアーゼ、Cas13aエンドヌクレアーゼ、Cas13bエンドヌクレアーゼ、Cas13cエンドヌクレアーゼ、又はCas13dエンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼと80%未満の同一性を有する。いくつかの実施形態では、当該リボ核酸配列は、(a) 配列番号5886~5887、5891、5893、若しくは5894のうちのいずれか1つ、又は(b) 配列番号5862~5885、5888~5890、5892、5895~5896、若しくは6279~6301のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの態様では、本開示は、操作されたヌクレアーゼ系であって、(a)(i) 標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているリボ核酸配列、及び(ii) エンドヌクレアーゼに結合するように構成されているリボ核酸配列を含み、当該リボ核酸配列が(a) 配列番号5886~5887、5891、5893、若しくは5894のうちのいずれか1つ、又は(b) 配列番号5862~5885、5888~5890、5892、5895~5896、若しくは6279~6301のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む、操作されたガイドリボ核酸構造と、当該操作されたガイドリボ核酸に結合するように構成されたクラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと、を含む、操作されたヌクレアーゼ系を提供する。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、配列番号5847~5861又は6258~6278を含む群から選択されるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に結合するように構成されている。いくつかの実施形態では、当該ガイドリボ核酸配列は、15~24ヌクレオチド長又は19~24ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、当該エンドヌクレアーゼのN末端又はC末端の近位に1つ以上の核局在化配列(NLS)を含む。いくつかの実施形態では、当該NLSは、配列番号5597~5612から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では系は、5'から3'の方向に：当該標的デオキシリボ核酸配列に対して5'側に少なくとも20ヌクレオチドの配列を含む第1の相同アーム、少なくとも10ヌクレオチドの合成DNA配列、及び当該標的配列に対して3'側に少なくとも20ヌクレオチドの配列を含む第2の相同アーム、を含む一本鎖又は二本鎖DNA修復鋳型を更に含む。いくつかの実施形態では、当該第1又は第2の相同アームは、少なくとも40、80、120、150、200、300、500、又は1,000ヌクレオチドの配列を含む。いくつかの実施形態では、当該配列同一性は、BLASTP、CLUSTALW、MUSCLE、MAFFT、又はSmith-Waterman 相溶性検索アルゴリズムのパラメーターを用いるCLUSTALWによって決定される。いくつかの実施形態では、当該配列同一性は、3のワード長(W)、10の期待値(E)のパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用した、当該BLASTP相溶性検索アルゴリズムによって決定される。

【0095】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 標的DNA分子中の標的配列と相補的であるヌクレオチド配列を含むDNA標的化セグメントと、(b) ハイブリダイズして二本鎖RNA(dsRNA)二重鎖を形成するヌクレオチドの2つの相補的なストレッチを含むタンパク質結合セグメントと、を含む、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドを提供し、当該ヌクレオチドの2つの相補的なストレッチは、介在するヌクレオチドと互いに共有結合しており、当該操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、配列番号5718~5846又は6257のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むエンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつ当該複合体を当該標的DNA

10

20

30

40

50

A分子の当該標的配列に標的化するように構成されている。いくつかの実施形態では、当該DNA標的化セグメントは、当該ヌクレオチドの2つの相補的なストレッチの両方の5'に位置付けられる。

【0096】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドのうちのいずれかをコードするデオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを提供する。

【0097】

いくつかの態様では、本開示は、生物における発現に最適化された操作された核酸配列を含む核酸を提供し、当該核酸は、配列番号5718～5846又は6257のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むエンドヌクレアーゼをコードする。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、当該エンドヌクレアーゼのN末端又はC末端の近位に1つ以上の核局在化配列(NLS)をコードする配列を含む。いくつかの実施形態では、当該NLSは、配列番号5597～5612から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、当該生物は、原核生物、細菌、真核生物、真菌、植物、哺乳類、齧歯類、又はヒトである。

【0098】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される核酸のうちのいずれかを含むベクターを提供する。いくつかの実施形態では、ベクターは、(a)標的デオキシリボ核酸配列にハイブリダイズするように構成されているリボ核酸配列と、(b)当該エンドヌクレアーゼに結合するように構成されているリボ核酸配列とを含む、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されている操作されたガイドリボ核酸構造をコードする核酸を更に含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミド、ミニサークル、CELID、アデノ随伴ウイルス(AAV)由来ビリオン、又はレンチウイルスである。

【0099】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかを含む細胞を提供する。

【0100】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される細胞のうちのいずれかを培養することを含む、エンドヌクレアーゼを製造する方法を提供する。

【0101】

いくつかの態様では、本開示は、二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを結合するか、切断するか、マーキングするか、又は修飾する方法を提供し、方法は、当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドを、当該エンドヌクレアーゼ及び当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドに結合するように構成されている操作されたガイド核酸構造との複合体におけるクラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼと接触させることを含み、当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)を含み、当該PAMは、配列番号5847～5861又は6258～6278からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、当該操作されたガイドリボ核酸構造の配列と相補的である配列を含む第1の鎖と、当該PAMを含む第2の鎖とを含む。いくつかの実施形態では、当該PAMは、当該操作されたガイドリボ核酸構造の当該配列と相補的である当該配列の3'末端に直接隣接する。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼは、Cas9 エンドヌクレアーゼ、Cas14 エンドヌクレアーゼ、Cas12a エンドヌクレアーゼ、Cas12b エンドヌクレアーゼ、Cas12c エンドヌクレアーゼ、Cas12d エンドヌクレアーゼ、Cas12e エンドヌクレアーゼ、Cas13a エンドヌクレアーゼ、Cas13b エンドヌクレアーゼ、Cas13c エンドヌクレアーゼ、又はCas13d エンドヌクレアーゼではない。いくつかの実施形態では、当該二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドは、真核生物、植物、真菌、哺乳類、齧歯類、又はヒト二本鎖デオキシリボ核酸ポリヌクレオチドである。

## 【0102】

いくつかの態様では、本開示は、標的核酸遺伝子座を修飾する方法を提供し、当該方法は、本明細書に記載される操作されたヌクレアーゼ系のうちのいずれかを当該標的核酸遺伝子座に送達することを含み、当該エンドヌクレアーゼは、当該操作されたガイドリボ核酸構造と複合体を形成するように構成されており、当該複合体は、当該複合体が当該標的核酸遺伝子座に結合すると、当該複合体が当該標的核酸遺伝子座を修飾するように構成されている。いくつかの実施形態では、当該標的核酸遺伝子座は、当該標的核酸遺伝子座を結合、ニッキング、切断、又はマーキングすることを含む。いくつかの実施形態では、当該標的核酸遺伝子座は、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）を含む。いくつかの実施形態では、当該標的核酸は、ゲノムDNA、ウイルスDNA、ウイルスRNA、又は細菌DNAを含む。いくつかの実施形態では、当該標的核酸遺伝子座は、インビトロである。いくつかの実施形態では、当該標的核酸遺伝子座は、細胞内にある。いくつかの実施形態では、当該細胞は、原核細胞、細菌細胞、真核細胞、真菌細胞、植物細胞、動物細胞、哺乳類細胞、齧歯類細胞、霊長類細胞、又はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、当該標的核酸遺伝子座への当該操作されたヌクレアーゼ系は、本明細書に記載される核酸のうちのいずれか又は本明細書に記載されるベクターのうちのいずれかを送達することを含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたヌクレアーゼ系を当該標的核酸遺伝子座に送達することは、当該エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含む核酸を送達することを含む。いくつかの実施形態では、当該核酸は、当該エンドヌクレアーゼをコードする当該オープンリーディングフレームが作動可能に連結されているプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたヌクレアーゼ系を当該標的核酸遺伝子座に送達することは、当該エンドヌクレアーゼをコードする当該オープンリーディングフレームを含むキャッピングされたmRNAを送達することを含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたヌクレアーゼ系を当該標的核酸遺伝子座に送達することは、翻訳されたポリペプチドを送達することを含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたヌクレアーゼ系を当該標的核酸遺伝子座に送達することは、リボ核酸（RNA）pol IIIプロモーターに作動可能に連結された当該操作されたガイドリボ核酸をコードするデオキシリボ核酸（DNA）を送達することを含む。いくつかの実施形態では、当該エンドヌクレアーゼは、当該標的遺伝子座で、又は当該標的遺伝子座の近位で、一本鎖切断又は二本鎖切断を誘導する。

## 【0103】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTRAC遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、（a）RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び（b）操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該TRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該操作されたガイドRNAは、配列番号5950～5958又は5959～5965のうちのいずれか1つの少なくとも19個の、少なくとも20個の、少なくとも21個の、少なくとも22個の、少なくとも23個の、又は少なくとも24個の連続するヌクレオチドと、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラスII、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%

の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を有する配列を含む R u v C I I I ドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、H N H ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421 若しくは配列番号 423 と少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 82% の同一性、少なくとも 84% の同一性、少なくとも 86% の同一性、少なくとも 88% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 5950 ~ 5958 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号 421 と少なくとも 75% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 5959 ~ 5965 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号 423 と少なくとも 75% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 5953 ~ 5957 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 5960 ~ 5961 又は 5963 ~ 5964 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含む。

10

20

30

40

50

【0104】

いくつかの態様では、本開示は、細胞における T R B C 遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び (b) 操作されたガイド RNA であって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該 T R B C 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 5966 ~ 6004 又は 6005 ~ 6025 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 19 個の、少なくとも 20 個の、少なくとも 21 個の、少なくとも 22 個の、少なくとも 23 個の、又は少なくとも 24 個の連続するヌクレオチドと、少なくとも 80%、少なくとも 82%、少なくとも 84%、少なくとも 86%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス II、タイプ II C a s エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242 又は配列番号 2244 と少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 82% の同一性、少なくとも 84% の同一性、少なくとも 86% の同一性、少なくとも 88% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を有する配列を含む R u v C I I I ドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、H N H ドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 421 若しくは配列番号 423 と少なくとも 75% の同一性、少なくとも 80% の同一性、少なくとも 82% の同一性、少なくとも 84% の同一性、少なくとも 86% の同一性、少なくとも 88% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、

少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号5966~6004のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6005~6025のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号423と少なくとも75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号5970、5971、5983、又は5984のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6006、6010、6011、又は6012のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。

10

#### 【0105】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるGR(NR3C1)遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該GR(NR3C1)遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6026~6090又は6091~6121のうちのいずれか1つの少なくとも19個の、少なくとも20個の、少なくとも21個の、少なくとも22個の、少なくとも23個の、又は少なくとも24個の連続するヌクレオチド連続するヌクレオチドと、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラスII、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含むRuvCI IIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421又は配列番号423と少なくとも75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6026~6090のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6091~6121のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号423と少なくとも75%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6027~6028、6029、6038、6043、6049、6076、6080、6081、又は6086のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも

20

30

40

50

85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6092、6115、又は6119のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。

【0106】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるAAVS1遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b)操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該AAVS1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6122～6152のうちのいずれか1つの少なくとも19個の、少なくとも20個の、少なくとも21個の、少なくとも22個の、少なくとも23個の、又は少なくとも24個の連続するヌクレオチドと、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラスII、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421若しくは配列番号423と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6122、6125～6126、6128、6131、6133、6136、6141、6143、又は6148のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。

【0107】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTIGIT遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b)操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該TIGIT遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6153～6181のうちのいずれか1つの少なくとも19個の、少なくとも20個の、少なくとも21個の、少なくとも22個の、少なくとも23個の、又は少なくとも24個の連続するヌクレオチドと、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99

%、又は100%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラスII、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421若しくは配列番号423と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号66155、6159、616、又は6172のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。

10

20

【0108】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるCD38遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び(b)操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該CD38遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6182~6248又は6249~6256のうちのいずれか1つの少なくとも19個の、少なくとも20個の、少なくとも21個の、少なくとも22個の、少なくとも23個の、又は少なくとも24個の連続するヌクレオチドと、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、クラスII、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421若しくは配列番号423と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少

30

40

50

なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 6182 ~ 6248 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号 421 と少なくとも 75% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 6249 ~ 6256 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含み、当該エンドヌクレアーゼは、配列番号 423 と少なくとも 75% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 6182 - 6183、6189、6191、6208、6210、6211、又は 6215 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイド RNA は、配列番号 6251 の少なくとも 18 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 85% の同一性を有する標的化配列を含む。

10

#### 【0109】

上記の細胞における特定の遺伝子座を編集するための方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、当該細胞は、末梢血単核細胞、T 細胞、NK 細胞、造血幹細胞 (HSC T)、又は B 細胞、又はそれらの任意の組み合わせである。

#### 【0110】

いくつかの態様では、本開示は、(a) 標的 DNA 分子中の標的配列に相補的であるヌクレオチド配列を含む DNA 標的化セグメントと、(b) ハイブリダイズして二本鎖 RNA (dsRNA) 二重鎖を形成するヌクレオチドの 2 つの相補的なストレッチを含むタンパク質結合セグメントと、を含む、操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドを提供し、当該ヌクレオチドの 2 つの相補的なストレッチは、介在するヌクレオチドと互いに共有結合しており、当該操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチドは、クラス 2、タイプ I I C a s エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように、かつ当該複合体を当該標的 DNA 分子の当該標的配列に標的化するように構成されており、当該 DNA 標的化セグメントは、配列番号 5950 ~ 5965、5966 ~ 6025、6026 ~ 6121、6122 ~ 6152、6153 ~ 6181、又は 6182 ~ 6256 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 19 個の、少なくとも 20 個、少なくとも 21 個、少なくとも 22 個、少なくとも 23 個、又は 24 個の連続するヌクレオチドと、少なくとも 80% の同一性を有する配列を含み、少なくとも 82% の同一性、少なくとも 84% の同一性、少なくとも 86% の同一性、少なくとも 88% の同一性、少なくとも 90% の同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性、又は少なくとも 100% の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該タンパク質結合セグメントは、配列番号 5466 又は 6304 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 85% の同一性を有する配列を含む。

20

30

#### 【0111】

いくつかの態様では、本開示は、編集された免疫細胞を生成するための系であって、(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、(b) 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼに結合するように構成されている請求項 97 に記載の操作されたガイドリボ核酸ポリヌクレオチド、及び (c) キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする配列に隣接する第 1 の相同アーム及び第 2 の相同アームを含む一本鎖又は二本鎖 DNA 修復鋳型を含む、編集された免疫細胞を生成するための系を提供する。いくつかの実施形態では、当該細胞は、末梢血単核細胞、T 細胞、NK 細胞、造血幹細胞 (HSC T)、若しくは B 細胞、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの態様では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、クラス II、タイプ II C a s エンドヌクレアーゼである。いくつかの態様では、当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号 2242 又は配列番号 2244 と少なくと

40

50

も75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの態様では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの態様では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421若しくは配列番号423と少なくとも75%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも82%の同一性、少なくとも84%の同一性、少なくとも86%の同一性、少なくとも88%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、又は少なくとも100%の同一性を有する配列を含む。

10

#### 【0112】

本開示の更なる態様及び利点は、本開示の例示的な実施形態のみが示され、記載されている、以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかになるであろう。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態をすることができ、そのいくつかの詳細は、全て本開示から逸脱することなく、様々な明白な点において改変することができる。したがって、図面及び説明は、本質的に例示とみなされるべきであり、限定的なものとしてみなされるべきではない。

20

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるB2M遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ及び、(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該B2M遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該B2M遺伝子座の当該領域は、配列番号6387~6468のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該Casエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプIICasエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプIICasエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHドメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6305~6386のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該B2M遺伝子座の当該領域は、配列番号6388、6399、6401、6403、6410、6413、6421、6446、及び6448のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6306、6317、6319、6321、6328、6331、6339、6364、及び6366のうちのいずれか1つと80%又は少なくとも90%同一である配列を含む。

30

40

#### 【0113】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTRAC遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ及び、(b) 操作され

50

たガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該TRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該TRAC遺伝子座の当該領域は、配列番号6509～6548のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該Casエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号421～431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6469～6508のうちのいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該TRAC遺伝子座の当該領域は、配列番号6517、6520、及び6523のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6477、6480、及び6483のうちのいずれか1つと80%、又は少なくとも90%同一である配列を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0114】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるHPRT遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ及び、(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該HPRT遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該HPRT遺伝子座の当該領域は、配列番号6616～6682のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該Casエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号421～431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421又は配列番号423と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6549～6615のうちのいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該HPRT遺伝子座の当該領域は、配列番号6619、6634、6673、6675、及び6679のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と、少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6552、6567、6606、6608、及び6612のうちのいずれか1つと80%又は少なくとも90%同一である配列を含む。

#### 【0115】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるTRBC1／2遺伝子座を編集する方法

を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ及び、(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該TRBC1/2遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該TRBC1/2遺伝子座の当該領域は、配列番号6722~6760又は6782~6802のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該Casエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421又は配列番号423と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6683~6721及び6761~6781のうちのいずれか1つと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、当該TRBC1/2遺伝子座の当該領域は、配列番号6734、6753、6790、及び6800のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該操作されたガイドRNAは、配列番号6695、6714、6769、及び6779のうちのいずれか1つと80%又は少なくとも90%同一である配列を含む。

10

20

30

40

【0116】

いくつかの態様では、本開示は、細胞におけるHAO1遺伝子座を編集する方法を提供し、方法は、当該細胞に、(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ及び、(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該HAO1遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、当該HAO1遺伝子座の当該領域は、配列番号11802~11820のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該Casエンドヌクレアーゼは、クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、当該クラス2、タイプII Casエンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号2242と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、HNHDメインを更に含む。いくつかの実施形態では、当該RNAガイドエンドヌクレアーゼは、配列番号421と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該HAO1遺伝子座の当該領域は、配列番号11806、11813、11816、及び11819のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、当該細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)である。いくつかの実施形態では、当該細胞は、T細胞若しくはその前駆体、又は造血幹細胞(HSC)である。

【0117】

参照による組み込み

本明細書において言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、それぞれ個々の刊

50

行物、特許、又は特許出願が、参照により組み込まれるべきことが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0118】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に特記して記載される。本発明の特徴及び利点のより良好な理解が、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面（本明細書において「図（Figure）」及び「図（FIG.）」）を参照することによって得られるだろう。

【0119】

【図1】 B2MのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

10

【図2A】 マウスTRACのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図2B】 マウスTRACのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図3】 HPRTのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図4】 ヒトTRBC1／2の遺伝子編集のフローサイトメトリーの結果を示す。

【図5】 Hepa1-6細胞におけるガイドスクリーニングの結果を示し、ガイドを、リポフェクタミンメッセンジャーマックスを使用してmRNA及びgRNAとして送達した。

【図6】 T細胞におけるmRNAエレクトロポレーションのためのNGSによる遺伝子編集結果の分析を示す。

20

【図7】 MG-3-6及びMG3-8に対する抗体を検出するために1：50の血清希釈で行われたスクリーニングからのELISA結果を示す（n=50）。この抗原に対する広範なワクチン接種のため破傷風トキソイドを陽性対照として使用した。破線上の血清試料は、抗体陽性とみなされ、この線は、陰性対照（ヒトアルブミン）の平均吸光度に平均から2つの標準偏差を加えたものを表す。\*対応のない学生t検定により測定した場合、\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*\*P<0.0001、ns、有意ではない。

【図8】 ヒト末梢血B細胞におけるTRACのDNA及び細胞表面タンパク質レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図9】 造血幹細胞におけるTRACのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図10】 リボ核タンパク質として送達されたMG3-6の人工多能性幹細胞（iPSC）におけるTRACのDNA及び細胞表面タンパク質レベルでの遺伝子編集結果を示す。

30

【図11】 mRNAとして送達されたMG3-6の人工多能性幹細胞（iPSC）におけるTRACのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図12】 初代T細胞におけるCD2のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図13】 初代T細胞におけるCD5のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図14】 MG3-6及びMG3-8による標的RNA切断を示す。

【図15】 T細胞におけるFASのDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図16】 T細胞におけるPD-1のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図17】 T細胞におけるhRosa26のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図18-1】 K562細胞におけるTRAC及びAAVS1のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

40

【図18-2】 K562細胞におけるTRAC及びAAVS1のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図19】 リポフェクタミンメッセンジャーマックスを使用してmRNA及びgRNAとして送達した場合の、Hep3B細胞における化学修飾されたMG3-6ヒトHAO-1ガイドの活性を示す。

【図20】 Hep3B細胞におけるヒトGPR146のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図21】 Hepa1-6細胞におけるマウスGPR146のDNAレベルでの遺伝子編集結果を示す。

50

【図 2 2】初代マウス肝細胞におけるマウス G P R 1 4 6 の D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 3】K 5 6 2 細胞における T R A C 及び A A V S 1 の D N A レベルでの遺伝子編集結果を示す。

【図 2 4】M G 3 及び M G 1 5 0 ファミリー由来のヌクレアーゼの系統発生分析を示す。いくつかの活性候補について P A M S e q L o g o 表現が示されている。参照 S a C a s 9 配列及び S p y C a s 9 配列が含まれていた。

【図 2 5】M G 1 5 ファミリー由来のヌクレアーゼの系統発生分析を示す。活性候補は丸印で強調表示される。参照 S a C a s 9、S p y C a s 9、及び A c C a s 9 配列を、アウトグループとして含めた。

【図 2 6】M G 1 2 3 - 1、M G 1 2 4 - 2、M G 1 2 5 - 1 及び M G 1 2 5 - 2 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 2 7】M G 1 2 5 - 3、M G 1 2 5 - 4、M G 1 2 5 - 5、及び M G 1 5 0 - 5 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 2 8】M G 1 5 0 - 6、M G 1 5 0 - 7、M G 1 5 0 - 8 及び M G 1 5 0 - 9 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 2 9】M G 3 - 1 8、M G 3 - 8 9、M G 3 - 9 0、及び M G 3 - 9 1 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 0】M G 3 - 9 2、M G 3 - 9 3、M G 3 - 9 5、及び M G 3 - 9 6 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 1】M G 3 - 1 0 3、M G 1 5 - 1 3 0、M G 1 5 - 1 4 6、及び M G 1 5 - 1 6 4 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 2】M G 1 5 - 1 6 6、M G 1 5 - 1 7 1、M G 1 5 - 1 7 2、及び M G 1 5 - 1 7 4 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 3】M G 1 5 - 1 8 4、M G 1 5 - 1 8 7、M G 1 5 - 1 9 1、及び M G 1 5 - 1 9 3 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 4】M G 1 5 - 1 9 5、M G 1 5 - 2 1 7、M G 1 5 - 2 1 8、及び M G 1 5 - 2 1 9 の P A M の S e q L o g o を示す。

【図 3 5】M G 1 5 - 1 7 7 の P A M の S e q L o g o を示す。

【0 1 2 0】

配列表の簡単な説明

本明細書とともに提出される配列表は、本開示による方法、組成物、及び系で使用するための例示的なポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列を提供する。以下は、その中の配列の例示的な説明である。

【0 1 2 1】

M G 1

配列番号 1 ~ 3 1 9 及び 7 2 8 5 ~ 7 2 9 3 は、M G 1 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0 1 2 2】

配列番号 1 8 2 7 ~ 2 1 4 0 は、上記の M G 1 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメインのペプチド配列を示す。

【0 1 2 3】

配列番号 3 6 3 8 ~ 3 9 5 5 は、上記の M G 1 ヌクレアーゼの H N H ドメインのペプチドを示す。

【0 1 2 4】

配列番号 5 4 7 6 ~ 5 4 7 9 は、上記の M G 1 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座（例えば、それぞれ配列番号 1 ~ 4 と同じ遺伝子座）に由来する M G 1 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【0 1 2 5】

配列番号 5 4 6 1 ~ 5 4 6 4 及び 1 1 1 3 0 は、M G 1 ヌクレアーゼ（例えば、それぞ

10

20

30

40

50

れ配列番号 1～4) と機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示し、N は、標的化配列のヌクレオチドを示す。

【0126】

配列番号 5572～5575 は、M G 1 ファミリー酵素 (配列番号 1～4) に対する E . c o l i コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0127】

配列番号 5588～5589 は、M G 1 ファミリー酵素 (配列番号 1 及び 3) に対するヒトコドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0128】

配列番号 5616～5632 は、M G 1 ファミリー酵素に特徴的なペプチドモチーフを示す。

【0129】

配列番号 9192～9255 は、M G 1 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0130】

配列番号 11229～11269 は、M G 1 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【0131】

M G 2

配列番号 320～420 及び 7294～7358 は、M G 2 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0132】

配列番号 2141～2241 は、上記の M G 2 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメインのペプチド配列を示す。

【0133】

配列番号 3955～4055 は、上記の M G 2 ヌクレアーゼの H N H ドメインのペプチドを示す。

【0134】

配列番号 5490～5494 及び 11159 は、上記の M G 2 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座 (例えば、それぞれ配列番号 320、321、323、325、及び 326 と同じ遺伝子座) に由来する M G 2 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【0135】

配列番号 5465 は、M G 2 ヌクレアーゼ (例えば、上記の配列番号 321) と機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【0136】

配列番号 5572～5575 は、M G 2 ファミリー酵素に対する E . c o l i コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0137】

配列番号 5631～5638 は、M G 2 ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【0138】

配列番号 9256～9322 は、M G 2 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0139】

配列番号 11270～11275 は、M G 2 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【0140】

M G 3

配列番号 421～431 は、M G 3 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0141】

10

20

30

40

50

配列番号 6803 は、5' UTR、NLS、CDS、NLS、3' UTR、及び poly A テールを含む MG3-6 ヌクレアーゼのヌクレオチド配列を示す。

【0142】

配列番号 2242 ~ 2252 は、上記の MG3 ヌクレアーゼの RuvC \_\_ III ドメインのペプチド配列を示す。

【0143】

配列番号 4056 ~ 4066 は、上記の MG3 ヌクレアーゼの HNH ドメインのペプチドを示す。

【0144】

配列番号 5495 ~ 5502 及び 11160 ~ 11162 は、上記の MG3 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座（例えば、それぞれ配列番号 421 ~ 428 と同じ遺伝子座）に由来する MG3 tracrRNA のヌクレオチド配列を示す。

10

【0145】

配列番号 5466 ~ 5467、11131、及び 11567 ~ 11576 は、MG3 ヌクレアーゼ（例えば、配列番号 421 ~ 423）と機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0146】

配列番号 5578 ~ 5580 は、MG3 ファミリー酵素に対する E. coli コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0147】

配列番号 5639 ~ 5648 は、MG3 ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

20

【0148】

配列番号 9323 ~ 9329 は、MG3 ヌクレアーゼの PAM 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0149】

配列番号 11108 及び 11530 ~ 11538 は、MG3 ヌクレアーゼの単一ガイド PAM のヌクレオチド配列を示す。

【0150】

配列番号 11276 ~ 11294 は、MG1 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

30

【0151】

配列番号 11373 は、MG3-6 mRNA をコードする DNA 配列のヌクレオチド配列を示す。

【0152】

MG3 a

配列番号 7369 ~ 7375 は、MG3 a ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0153】

配列番号 11099 は、MG3 a ヌクレアーゼの PAM 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

40

【0154】

MG3 b

配列番号 7376 ~ 7390 は、MG3 b ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0155】

配列番号 11100 ~ 11107 は、MG3 b ヌクレアーゼの PAM 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0156】

MG4

配列番号 432 ~ 660 及び 7391 ~ 7535 は、MG4 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

50

【0157】

配列番号2253～2481は、上記のMG4ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIDメインのペプチド配列を示す。

【0158】

配列番号4067～4295は、上記のMG4ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

【0159】

配列番号5503は、上記のMG4ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG4 *teracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

【0160】

配列番号5468は、MG4ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0161】

配列番号5649は、MG4ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【0162】

配列番号9330～9485は、MG4ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0163】

配列番号11295～11303は、MG4ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【0164】

MG5

配列番号7536～7583は、MG5ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0165】

配列番号9486～9526は、MG5ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0166】

MG6

配列番号661～668及び7584～7587は、MG6ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0167】

配列番号2482～2489は、上記のMG6ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIDメインのペプチド配列を示す。

【0168】

配列番号4296～4303は、上記のMG3ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

【0169】

配列番号9527～9531は、MG6ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0170】

MG7

配列番号669～677は、MG7ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0171】

配列番号2490～2498は、上記のMG7ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIDメインのペプチド配列を示す。

【0172】

配列番号4304～4312は、上記のMG3ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

【0173】

配列番号5504は、上記のMG7ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG7 *t*

10

20

30

40

50

r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 7 4 】

配列番号 9 5 3 2 ～ 9 5 3 5 は、M G 7 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 1 7 5 】

M G 1 4

配列番号 6 7 8 ～ 9 2 9 及び 7 5 8 8 ～ 7 5 9 7 は、M G 1 4 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 1 7 6 】

配列番号 2 4 9 9 ～ 2 7 5 0 は、上記の M G 1 4 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 1 7 7 】

配列番号 4 3 1 3 ～ 4 5 6 4 は、上記の M G 1 4 ヌクレアーゼの H N H ドメインのペプチドを示す。

【 0 1 7 8 】

配列番号 5 5 0 5 及び 1 1 1 6 3 ～ 1 1 1 6 7 は、上記の M G 1 4 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 1 4 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 7 9 】

配列番号 5 5 8 1 は、M G 1 4 ファミリー酵素に対する E . c o l i コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 8 0 】

配列番号 5 6 5 0 ～ 5 6 6 7 は、M G 1 4 ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【 0 1 8 1 】

配列番号 9 5 3 6 ～ 9 6 1 1 は、M G 1 4 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 1 8 2 】

配列番号 1 1 1 0 9 ～ 1 1 1 1 3 は、M G 1 4 ヌクレアーゼの単一ガイド P A M のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 8 3 】

配列番号 1 1 1 3 2 ～ 1 1 1 3 6 は、M G 1 4 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 8 4 】

配列番号 1 1 3 0 4 ～ 1 1 3 1 2 は、M G 1 4 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 8 5 】

M G 1 5

配列番号 9 3 0 ～ 1 0 9 2 、 7 5 9 8 ～ 7 6 2 2 、 及び 1 1 5 9 3 ～ 1 1 6 1 6 は、M G 1 5 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 1 8 6 】

配列番号 2 7 5 1 ～ 2 9 1 3 は、上記の M G 1 5 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 1 8 7 】

配列番号 4 5 6 5 ～ 4 7 2 7 は、上記の M G 1 5 ヌクレアーゼの H N H ドメインのペプチドを示す。

【 0 1 8 8 】

配列番号 5 5 0 6 及び 1 1 1 6 8 ～ 1 1 1 7 2 は、上記の M G 1 5 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 1 5 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 1 8 9 】

配列番号 5 4 7 0 及び 1 1 5 7 7 ～ 1 1 5 9 2 は、M G 1 5 ヌクレアーゼと機能するよ

10

20

30

40

50

うに操作された *s g R N A* のヌクレオチド配列を示す。

【0190】

配列番号5582は、MG15ファミリー酵素に対する *E. coli* コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0191】

配列番号5668～5675は、MG15ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【0192】

配列番号9612～9671は、MG15ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0193】

配列番号11539～11554は、MG15ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0194】

MG16

配列番号1093～1353及び7623～7698は、MG16ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0195】

配列番号2914～3174は、上記のMG16ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIドメインのペプチド配列を示す。

【0196】

配列番号4728～4988は、上記のMG16ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

【0197】

配列番号5507及び11173～11174は、上記のMG16ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG16 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0198】

配列番号5471及び11137は、MG16ヌクレアーゼと機能するように操作された *s g R N A* のヌクレオチド配列を示す。

【0199】

配列番号5583は、MG16ファミリー酵素に対する *E. coli* コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0200】

配列番号5676～5678は、MG16ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【0201】

配列番号9672～9842は、MG16ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0202】

配列番号11114は、MG16ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0203】

配列番号11313～11320は、MG16ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【0204】

MG17

配列番号7699～7715は、MG17ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0205】

配列番号9843～9856は、MG17ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

10

20

30

40

50

## 【0206】

配列番号11115は、MG17ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

## 【0207】

配列番号11138は、MG17ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0208】

配列番号11175は、上記のMG17ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG17 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0209】

MG18

配列番号1354～1511は、MG18ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0210】

配列番号3175～3330は、上記のMG18ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIDメインのペプチド配列を示す。

## 【0211】

配列番号4989～5146は、上記のMG18ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

## 【0212】

配列番号5508は、上記のMG18ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG18 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0213】

配列番号5472は、MG18ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0214】

配列番号5584は、MG18ファミリー酵素に対するE. coli コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

## 【0215】

配列番号5679～5686は、MG18ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

## 【0216】

配列番号9857～9891は、MG18ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0217】

配列番号11321～11327は、MG18ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

## 【0218】

MG21

配列番号1512～1655及び7716～7733は、MG21ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0219】

配列番号3331～3474は、上記のMG21ヌクレアーゼのRuvC\_\_IIIDメインのペプチド配列を示す。

## 【0220】

配列番号5147～5290は、上記のMG21ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

## 【0221】

配列番号5509及び11176～11178は、上記のMG21ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG21 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0222】

10

20

30

40

50

配列番号 5 4 7 3 及び 1 1 1 3 9 は、M G 2 1 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 2 3 】

配列番号 5 5 8 5 は、M G 2 1 ファミリー酵素に対する E . c o l i コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 2 4 】

配列番号 5 6 8 7 ～ 5 6 9 2 及び 5 6 7 4 ～ 5 6 7 5 は、M G 2 1 ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【 0 2 2 5 】

配列番号 9 8 9 2 ～ 9 9 5 1 は、M G 2 1 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 2 6 】

配列番号 1 1 1 1 6 は、M G 2 1 ヌクレアーゼの単一ガイド P A M のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 2 7 】

配列番号 1 1 3 2 8 ～ 1 1 3 3 6 は、M G 2 1 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 2 8 】

M G 2 2

配列番号 1 6 5 6 ～ 1 7 5 5 は、M G 2 2 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 2 9 】

配列番号 3 4 7 5 ～ 3 5 6 8 は、上記の M G 2 2 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 3 0 】

配列番号 5 2 9 1 ～ 5 3 8 9 は、上記の M G 2 2 ヌクレアーゼの H N H ドメインのペプチドを示す。

【 0 2 3 1 】

配列番号 5 5 1 0 及び 1 1 1 7 9 ～ 1 1 1 8 0 は、上記の M G 2 2 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 2 2 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 3 2 】

配列番号 5 4 7 4 は、M G 2 2 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 3 3 】

配列番号 5 5 8 6 は、M G 2 2 ファミリー酵素に対する E . c o l i コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 3 4 】

配列番号 5 6 9 4 ～ 5 6 9 9 は、M G 2 2 ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【 0 2 3 5 】

配列番号 9 9 5 2 ～ 9 9 8 2 は、M G 2 2 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 3 6 】

配列番号 1 1 3 3 7 ～ 1 1 3 4 4 は、M G 2 2 ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 3 7 】

M G 2 3

配列番号 1 7 5 6 ～ 1 8 2 6 及び 7 7 3 4 ～ 7 7 3 5 は、M G 2 3 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 3 8 】

配列番号 3 5 6 9 ～ 3 6 3 7 は、上記の M G 2 3 ヌクレアーゼの R u v C \_ I I I ドメ

10

20

30

40

50

インのペプチド配列を示す。

【0239】

配列番号5390～5460は、上記のMG23ヌクレアーゼのHNHドメインのペプチドを示す。

【0240】

配列番号5511及び11181～11182は、上記のMG23ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG23 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0241】

配列番号5475及び11140は、MG23ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0242】

配列番号5587は、MG23ファミリー酵素に対するE. coli コドン最適化コード配列のヌクレオチド配列を示す。

【0243】

配列番号5700～5717は、MG23ファミリー酵素に特徴的なペプチド配列を示す。

【0244】

配列番号9983～10004は、MG23ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0245】

配列番号11345～11351は、MG23ヌクレアーゼの標的部位のヌクレオチド配列を示す。

【0246】

MG24

配列番号7736～8027は、MG24ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0247】

配列番号10005～10162は、MG24ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0248】

MG25

配列番号8028～8091は、MG25ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0249】

配列番号10163～10211は、MG25ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0250】

MG38

配列番号8092～8095は、MG38ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0251】

配列番号10212～10214は、MG38ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0252】

MG40

配列番号5718～5750及び8096～8163は、MG40ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0253】

配列番号5847～5852は、MG40ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【0254】

配列番号5862～5873は、MG40ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

10

20

30

40

50

【0255】

配列番号10215～10263は、MG40ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0256】

配列番号11183～11188は、上記のMG40ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG40 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

【0257】

MG41

配列番号8164～8286は、MG41ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0258】

配列番号10264～10304は、MG41ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0259】

MG42

配列番号8287～8356は、MG42ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0260】

配列番号10305～10355は、MG42ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0261】

MG43

配列番号8357～8453は、MG43ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0262】

配列番号10356～10412は、MG43ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0263】

配列番号11117は、MG43ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0264】

配列番号11141は、MG43ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0265】

配列番号11189は、上記のMG43ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG43 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

【0266】

MG44

配列番号8454～8496は、MG44ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0267】

配列番号10413～10555は、MG44ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0268】

配列番号11190は、上記のMG44ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG44 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

【0269】

MG46

配列番号8497～8634は、MG46ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0270】

配列番号10556～10633は、MG46ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0271】

配列番号11191は、上記のMG46ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG4

10

20

30

40

50

6 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 7 2 】

M G 4 7

配列番号 5 7 5 1 ～ 5 7 6 8 及び 8 6 3 5 ～ 8 6 6 4 は、M G 4 7 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 7 3 】

配列番号 5 8 5 3 ～ 5 8 5 4 は、M G 4 7 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 2 7 4 】

配列番号 5 8 7 8 ～ 5 8 8 1 は、M G 4 7 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 7 5 】

配列番号 1 0 6 3 4 ～ 1 0 6 5 6 は、M G 4 7 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 7 6 】

配列番号 1 1 1 9 2 ～ 1 1 1 9 3 は、上記の M G 4 7 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 4 7 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 7 7 】

M G 4 8

配列番号 5 7 6 9 ～ 5 8 0 4 及び 8 6 6 5 は、M G 4 8 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 7 8 】

配列番号 5 8 5 5 ～ 5 8 5 6 は、M G 4 8 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 2 7 9 】

配列番号 5 8 8 6 、 5 8 9 0 、 5 8 9 3 、 及び 1 1 1 9 4 は、上記の M G 4 8 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 4 8 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 8 0 】

配列番号 5 8 8 7 、 5 8 9 1 、 及び 5 8 9 4 は、本明細書に記載される M G 4 8 ヌクレアーゼに関連する C R I S P R リピートを示す。

【 0 2 8 1 】

配列番号 5 8 8 8 ～ 5 8 8 9 、 5 8 9 2 、 及び 5 8 9 5 ～ 5 8 9 6 は、M G 4 8 ヌクレアーゼと機能するように設計された推定 s g R N A を示す。

【 0 2 8 2 】

配列番号 1 0 6 5 7 ～ 1 0 6 6 2 は、M G 4 8 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 8 3 】

配列番号 1 1 1 4 2 ～ 1 1 1 4 3 は、M G 4 8 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 8 4 】

M G 4 9

配列番号 5 8 0 5 ～ 5 8 2 3 及び 8 6 6 6 ～ 8 6 7 7 は、M G 4 9 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 8 5 】

配列番号 5 8 5 7 ～ 5 8 5 8 は、M G 4 9 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 2 8 6 】

配列番号 5 8 6 2 ～ 5 8 7 3 は、M G 4 0 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 8 7 】

10

20

30

40

50

配列番号 5 8 7 6 ~ 5 8 7 7 は、M G 4 9 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 8 8 】

配列番号 1 0 6 6 3 ~ 1 0 6 7 5 は、M G 4 9 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 8 9 】

配列番号 1 1 1 9 5 ~ 1 1 1 9 6 は、上記の M G 4 9 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 4 9 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 9 0 】

M G 5 0

配列番号 5 8 2 4 ~ 5 8 2 6 及び 8 6 7 8 ~ 8 6 8 2 は、M G 5 0 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 9 1 】

配列番号 5 8 5 9 は、M G 5 0 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 2 9 2 】

配列番号 5 8 8 4 ~ 5 8 8 5 は、M G 5 0 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 9 3 】

配列番号 1 0 6 7 6 ~ 1 0 6 8 2 は、M G 5 0 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 9 4 】

配列番号 1 1 1 9 7 は、上記の M G 5 0 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 5 0 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 9 5 】

M G 5 1

配列番号 5 8 2 7 ~ 5 8 3 0 及び 8 6 8 3 ~ 8 7 0 5 は、M G 5 1 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 2 9 6 】

配列番号 5 8 6 0 は、M G 5 1 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 2 9 7 】

配列番号 5 8 8 2 ~ 5 8 8 3 は、M G 5 1 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 2 9 8 】

配列番号 1 0 6 8 3 ~ 1 0 7 0 4 は、M G 5 1 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 2 9 9 】

配列番号 1 1 1 9 8 は、上記の M G 5 1 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 5 1 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 0 0 】

M G 5 2

配列番号 5 8 3 1 ~ 5 8 4 6 及び 8 7 0 6 は、M G 5 2 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 3 0 1 】

配列番号 5 8 6 1 は、M G 5 2 ヌクレアーゼに関連するプロトスペーサー隣接モチーフを示す。

【 0 3 0 2 】

配列番号 5 8 7 4 ~ 5 8 7 5 は、M G 5 2 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

10

20

30

40

50

## 【0303】

配列番号10705～10710は、MG52ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0304】

配列番号11199は、上記のMG52ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG52 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0305】

## MG71

配列番号10711～10712は、MG71ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0306】

配列番号11144～11145は、MG71ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0307】

配列番号11200～11201は、上記のMG71ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG71 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0308】

## MG72

配列番号11202は、上記のMG72ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG72 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0309】

## MG73

配列番号10713～10718は、MG73ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0310】

配列番号11203～11204は、上記のMG73ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG73 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0311】

## MG74

配列番号10719～10732は、MG74ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0312】

配列番号11205は、上記のMG74ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG74 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0313】

## MG86

配列番号8707～8737は、MG86ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0314】

配列番号10733～10791は、MG86ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

## 【0315】

配列番号11118は、MG86ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

## 【0316】

配列番号11206～11207は、上記のMG86ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG86 *tracrRNA*のヌクレオチド配列を示す。

## 【0317】

## MG87

配列番号8738～8747は、MG87ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0318】

配列番号 10792～10828 は、MG87ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0319】

配列番号 11208～11210 は、上記のMG87ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG87 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0320】

MG88

配列番号 10829～10841 は、MG88ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0321】

配列番号 11211～11213 は、上記のMG88ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG88 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0322】

MG89

配列番号 10842～10854 は、MG89ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0323】

配列番号 11214～11215 は、上記のMG89ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG89 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0324】

MG94

配列番号 8748～8781 は、MG94ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0325】

配列番号 10855～10860 は、MG94ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0326】

配列番号 11119～11120 は、MG94ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0327】

配列番号 11146～11147 は、MG94ヌクレアーゼと機能するように操作された *sgRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0328】

配列番号 11216～11217 は、上記のMG94ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG94 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0329】

MG95

配列番号 8782～8785 は、MG95ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0330】

配列番号 10861～10863 は、MG95ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0331】

配列番号 11121～11122 は、MG95ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0332】

配列番号 11148～11149 は、MG95ヌクレアーゼと機能するように操作された *sgRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0333】

配列番号 11218～11219 は、上記のMG95ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG95 *tracrRNA* のヌクレオチド配列を示す。

【0334】

10

20

30

40

50

**M G 9 6**

配列番号 8 7 8 6 ~ 8 8 1 4 は、M G 9 6 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 3 3 5 】

配列番号 1 0 8 6 4 ~ 1 0 8 8 4 は、M G 9 6 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 3 3 6 】

配列番号 1 1 1 2 3 は、M G 9 6 ヌクレアーゼの単一ガイド P A M のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 3 7 】

配列番号 1 1 1 5 0 は、M G 9 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 3 8 】

配列番号 1 1 2 2 0 は、上記の M G 9 6 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 9 6 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 3 9 】

**M G 9 7**

配列番号 8 8 1 5 ~ 8 8 1 8 は、M G 9 7 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 3 4 0 】

配列番号 1 0 8 8 5 ~ 1 0 8 8 7 は、M G 9 7 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 3 4 1 】

**M G 9 8**

配列番号 8 8 1 9 ~ 8 9 5 9 は、M G 9 8 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 3 4 2 】

配列番号 1 0 8 8 8 ~ 1 0 9 3 6 は、M G 9 8 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 3 4 3 】

配列番号 1 1 1 2 4 ~ 1 1 1 2 5 は、M G 9 8 ヌクレアーゼの単一ガイド P A M のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 4 4 】

配列番号 1 1 1 5 1 ~ 1 1 1 5 2 は、M G 9 8 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 4 5 】

配列番号 1 1 2 2 1 ~ 1 1 2 2 2 は、上記の M G 9 8 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 9 8 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 4 6 】

**M G 9 9**

配列番号 1 1 1 5 3 は、M G 9 9 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 4 7 】

配列番号 1 1 2 2 3 は、上記の M G 9 9 ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来する M G 9 9 t r a c r R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 4 8 】

**M G 1 0 0**

配列番号 8 9 6 0 ~ 9 0 3 6 は、M G 1 0 0 ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【 0 3 4 9 】

配列番号 1 0 9 3 7 ~ 1 0 9 9 1 は、M G 1 0 0 ヌクレアーゼの P A M 相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【 0 3 5 0 】

配列番号 1 1 1 2 6 は、M G 1 0 0 ヌクレアーゼの単一ガイド P A M のヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列を示す。

【0351】

配列番号11154～11155は、MG100ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0352】

配列番号11224～11225は、上記のMG100ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG100 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0353】

MG111

配列番号9037～9126は、MG111ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0354】

配列番号10992～11046は、MG111ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0355】

配列番号11127～11128は、MG111ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0356】

配列番号11156～11157は、MG111ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0357】

配列番号11226～11227は、上記のMG111ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG111 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0358】

MG112

配列番号9127～9149は、MG112ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0359】

配列番号11047～11062は、MG112ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0360】

MG116

配列番号9150～9191は、MG116ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0361】

配列番号11063～11098は、MG116ヌクレアーゼのPAM相互作用ドメインのペプチド配列を示す。

【0362】

配列番号11129は、MG116ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

【0363】

配列番号11158は、MG116ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0364】

配列番号11228は、上記のMG116ヌクレアーゼと同じ遺伝子座に由来するMG116 tracrRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0365】

MG123

配列番号11617～11624は、MG123ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

【0366】

配列番号11518は、MG123ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

10

20

30

40

50

## 【0367】

配列番号11555は、MG123ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0368】

MG124

配列番号11625～11626は、MG124ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0369】

配列番号11519は、MG124ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

## 【0370】

配列番号11556は、MG124ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0371】

MG125

配列番号11627～11707は、MG125ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0372】

配列番号11520～11524は、MG125ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

## 【0373】

配列番号11557～11561は、MG125ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0374】

MG150

配列番号7359～7368及び11708～11710は、MG150ヌクレアーゼの全長ペプチド配列を示す。

## 【0375】

配列番号11525～11529は、MG150ヌクレアーゼの単一ガイドPAMのヌクレオチド配列を示す。

## 【0376】

配列番号11562～11566は、MG150ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0377】

B2M標的化

配列番号6305～6386は、B2Mを標的化するために、MG3-6ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0378】

配列番号6387～6468は、B2M標的部位のDNA配列を示す。

## 【0379】

TRAC標的化

配列番号6469～6508及び6804は、TRACを標的化するために、MG3-6ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0380】

配列番号6509～6548及び6805は、TRAC標的部位のDNA配列を示す。

## 【0381】

HPRT標的化

配列番号6549～6615は、HPRTを標的化するために、MG3-6ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

## 【0382】

10

20

30

40

50

配列番号 6 6 1 6 ~ 6 6 8 2 は、H P R T 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 T R B C 1 / 2 標的化

【 0 3 8 3 】

配列番号 6 6 8 3 ~ 6 7 2 1 は、T R B C 1 / 2 を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 8 4 】

配列番号 6 7 2 2 ~ 6 7 6 0 は、T R B C 1 / 2 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 8 T R B C 1 / 2 標的化

【 0 3 8 5 】

配列番号 6 7 6 1 ~ 6 7 8 1 は、T R B C 1 / 2 を標的化するために、M G 3 - 8 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 8 6 】

配列番号 6 7 8 2 ~ 6 8 0 2 は、T R B C 1 / 2 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 C D 2 標的化

【 0 3 8 7 】

配列番号 6 8 1 1 ~ 6 8 5 2 は、C D 2 を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 8 8 】

配列番号 6 8 5 3 ~ 6 8 9 4 は、C D 2 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 C D 5 標的化

【 0 3 8 9 】

配列番号 6 8 9 5 ~ 6 9 5 8 は、C D 5 を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 9 0 】

配列番号 6 9 5 9 ~ 7 0 2 2 は、C D 5 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 F A S 標的化

【 0 3 9 1 】

配列番号 7 0 2 3 ~ 7 0 5 6 は、F A S を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 9 2 】

配列番号 7 0 5 7 ~ 7 0 9 0 は、F A S 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 P D - 1 標的化

【 0 3 9 3 】

配列番号 7 0 9 1 ~ 7 1 2 8 は、P D - 1 を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 9 4 】

配列番号 7 1 2 9 ~ 7 1 6 6 は、P D - 1 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 3 - 6 h R o s a 2 6 標的化

【 0 3 9 5 】

配列番号 7 1 6 7 ~ 7 1 9 8 は、h R o s a 2 6 を標的化するために、M G 3 - 6 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 9 6 】

配列番号 7 1 9 9 ~ 7 2 3 0 は、h R o s a 2 6 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 2 1 - 1 T R A C 標的化

【 0 3 9 7 】

配列番号 7 2 3 1 ~ 7 2 3 4 は、T R A C を標的化するために、M G 2 1 - 1 ヌクレアーゼと機能するように操作された s g R N A のヌクレオチド配列を示す。

【 0 3 9 8 】

配列番号 7 2 3 5 ~ 7 2 3 8 は、T R A C 標的部位の D N A 配列を示す。

M G 2 3 - 1 T R A C 標的化

10

20

30

40

50

【0399】

配列番号7239～7247は、TRACを標的化するために、MG23-1ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0400】

配列番号7248～7256は、TRAC標的部位のDNA配列を示す。

MG14-241 AAVS1標的化

【0401】

配列番号11508～11510は、AAVS1を標的化するために、MG14-241ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0402】

配列番号11511～11513は、AAVS1標的部位のDNA配列を示す。

MG23-1 AAVS1標的化

【0403】

配列番号7257～7260は、AAVS1を標的化するために、MG23-1ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0404】

配列番号7261～7264は、AAVS1標的部位のDNA配列を示す。

MG71-2 AAVS1標的化

【0405】

配列番号7265～7266は、AAVS1を標的化するために、MG71-2ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0406】

配列番号7267～7268は、AAVS1標的部位のDNA配列を示す。

MG73-1 TRAC標的化

【0407】

配列番号7269は、TRACを標的化するために、MG73-1ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0408】

配列番号7270は、TRAC標的部位のDNA配列を示す。

MG89-2 TRAC標的化

【0409】

配列番号7271～7277は、TRACを標的化するために、MG89-2ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0410】

配列番号7278～7284は、TRAC標的部位のDNA配列を示す。

MG99-1 TRAC標的化

【0411】

配列番号11514～11515は、TRACを標的化するために、MG99-1ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0412】

配列番号11516～11517は、TRAC標的部位のDNA配列を示す。

MG3-6 ヒトHAO-1標的化

【0413】

配列番号11352～11372は、HAO-1を標的化するために、MG3-6ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

MG3-6 ヒトGPR146標的化

【0414】

配列番号11374～11405は、ヒトGPR146を標的化するために、MG3-6ヌクレアーゼと機能するように操作されたsgRNAのヌクレオチド配列を示す。

【0415】

10

20

30

40

50

配列番号 11406～11437 は、ヒト GPR146 標的部位の DNA 配列を示す。  
MG3-6 マウス GPR146 標的化

【0416】

配列番号 11438～11472 は、マウス GPR146 を標的化するために、MG3-6 ヌクレアーゼと機能するように操作された sgRNA のヌクレオチド配列を示す。

【0417】

配列番号 11473～11507 は、マウス GPR146 標的部位の DNA 配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0418】

本発明の様々な実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。多数の変形、変更、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じ得る。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が用いられ得ることは、理解されるべきである。

【0419】

本明細書に開示されるいくつかの方法の実践は、別段の示唆がない限り、免疫学、生化学、化学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、ゲノミクス、及び組換え DNA の技術を用いる。例えば、Sambrook and Green, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4<sup>th</sup> Edition (2012)、the series Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds.), the series Methods In Enzymology (Academic Press, Inc.), PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6<sup>th</sup> Edition (R. I. Freshney, ed. (2010)) を参照されたい (参照により本明細書に完全に組み込まれる)。

【0420】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が別途明確に示さない限り、複数形も含むことが意図される。更に、用語「含むこと」、「含む」、「有すること」、「有する」、「有する」、又はそのバリエーションが、詳細な説明及び／又は特許請求の範囲のいずれかで使用される限りにおいて、かかる用語は、用語「含むこと」と類似した様式で包含的であることが意図される。

【0421】

用語「約」又は「およそ」は、当業者によって決定される特定の値についての許容可能な誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定又は決定されるか、すなわち、測定系の限界に部分的に依存する。例えば、「約」は、当該技術分野の慣行によると、1又は2つ以上の標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%、最大15%、最大10%、最大5%、又は最大1%の範囲を意味し得る。

【0422】

本明細書で使用される場合、「細胞」は概して生物学的細胞を指す。細胞は、生きている生物の基本的な構造、機能、又は生物学的単位であり得る。細胞は、1つ以上の細胞を有する任意の生物を起源とし得る。いくつかの非限定的な例としては、原核細胞、真核生物の細胞、細菌細胞、古細菌細胞、単一細胞の真核生物の細胞、原虫細胞、植物由来の細胞 (例えば、植物作物、果実、野菜、穀物、大豆、トウモロコシ、トウモロコシ、小麦、種子、トマト、米、キャッサバ、サトウキビ、カボチャ、乾草、ジャガイモ、綿、大麻、タバコ、開花している植物、針葉樹、ジムノスパーム、シダ、ヒカゲノカズラ、ツノゴケ

10

20

30

40

50

、コケ植物、コケ由来の細胞)、藻類の細胞(例えば、ボトリオコッカス・ブラウニイ(*Botryococcus braunii*)、クラミドモナス・ラインハートティ(*Chlamydomonas reinhardtii*)、ナンノクロロプシス・ガジタナ(*Nannochloropsis gaditana*)、クロレラ・ピレノイドサ(*Chlorella pyrenoidosa*)、サルガッサム・パテンスC. アガード(*Sargassum patens* C. Agardh)など)、海藻(例えば、ケルプ)、真菌細胞(例えば、酵母細胞、キノコ由来の細胞)、動物細胞、脊椎動物(例えば、フルーツフライ、クニダリアン、エキノデルム、線虫など)由来の細胞、脊椎動物(例えば、魚、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類)由来の細胞、哺乳類(例えば、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、齧歯類、ラット、マウス、非ヒト霊長類、ヒトなど)由来の細胞などが挙げられる。場合によっては、細胞は、天然の生物に由来するものではない(例えば、細胞は、合成的に作製されてもよく、時には人工細胞と呼ばれることがある)。

10

#### 【0423】

本明細書で使用される場合、用語「ヌクレオチド」は、概して、塩基-糖-リン酸の組み合わせを指す。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチドを含んでもよい。ヌクレオチドは、合成ヌクレオチド類似体を含んでもよい。ヌクレオチドは、核酸配列(例えば、デオキシリボ核酸(DNA)及びリボ核酸(RNA))の単量体単位であってもよい。ヌクレオチドという用語は、リボヌクレオシド三リン酸アデノシン三リン酸(ATP)、ウリジン三リン酸(UTP)、シトシン三リン酸(CTP)、グアノシン三リン酸(GTP)及びデオキシリボヌクレオシド三リン酸、例えば、dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP、又はその誘導体を含み得る。かかる誘導体としては、例えば、[αS] dATP、7-デアザ-dGTP及び7-デアザ-dATP、並びにそれらを含む核酸分子にヌクレアーゼ耐性を付与するヌクレオチド誘導体を挙げることができる。本明細書で使用される場合、ヌクレオチドという用語は、ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸(ddNTP)及びその誘導体を指す場合がある。ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸の例としては、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP、及びddTTPが挙げられるが、これらに限定されない。ヌクレオチドは、光学的に検出可能な部分(例えば、フルオロフォア)を含む部分を使用するなど、非標識又は検出可能に標識されてもよい。標識はまた、量子ドットを用いて行われてもよい。検出可能な標識としては、例えば、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、生物発光標識、及び酵素標識を挙げることができる。ヌクレオチドの蛍光標識は、フルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン(FAM)、2',7'-ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシフルオレセイン(JOE)、ローダミン、6-カルボキシローダミン(R6G)、N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX)、4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸(DABCYL)、カスケードブルー、オレゴングリーン、テキサスレッド、シアニン及び5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS)を含むが、これらに限定されない。蛍光標識されたヌクレオチドの具体的な例としては、Perkin Elmer、Foster City、Califから入手可能な[R6G] dUTP、[TAMRA] dUTP、[R110] dCTP、[R6G] dCTP、[TAMRA] dCTP、[JOE] ddATP、[R6G] ddATP、[FAM] ddCTP、[R110] ddCTP、[TAMRA] ddGTP、[ROX] ddTTP、[dR6G] ddATP、[dR110] ddCTP、[dTAMRA] ddGTP、及び[dROX] ddTTP、Amersham、Arlington Heights、Ill. から入手可能なフルオロ結合デオキシヌクレオチド、フルオロ結合Cy3-dCTP、フルオロ結合Cy5-dCTP、フルオロ結合フルオロX-dCTP、フルオロ結合Cy3-dUTP、及びフルオロ結合Cy5-dUTP、Boehringer Mannheim、Indianapolis、Ind. から入手可能なフルオレセイン-15-dATP、フルオレセイン-12-dUTP、テトラメチル-ローダミン-6-dUTP、IR770-9-dATP、フルオレセイン-12-ddUTP、フルオレセイン-12-UTP、及びフル

20

30

40

50

オレセイン-15-2'-dATP、並びにMolecular Probes、Eugene、Oregonから入手可能な染色体標識ヌクレオチド、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、カスケードブルー-7-UTP、カスケードブルー-7-dUTP、フルオレセイン-12-UTP、フルオレセイン-12-dUTP、オレゴングリーン488-5-dUTP、ローダミンググリーン-5-UTP、ローダミンググリーン-5-dUTP、テトラメチルローダミン-6-UTP、テトラメチルローダミン-6-dUTP、テキサスレッド-5-UTP、テキサスレッド-5-dUTP、及びテキサスレッド-12-dUTPを挙げることができる。ヌクレオチドはまた、化学修飾によって標識又は印付けられてもよい。化学修飾された単一ヌクレオチドは、ビオチン-dNTPであり得る。ビオチン化dNTPのいくつかの非限定的な例としては、ビオチン-dATP（例えば、ビオチン-N6-d-dATP、ビオチン-14-dATP）、ビオチン-dCTP（例えば、ビオチン-11-dCTP、ビオチン-14-dCTP）、及びビオチン-dUTP（例えば、ビオチン-11-dUTP、ビオチン-16-dUTP、ビオチン-20-dUTP）が挙げられる。

10

#### 【0424】

用語「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸」は、概して、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はその類似体のいずれかを、一本鎖、二本鎖、又は多本鎖の形態で、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すように互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、細胞にとって外因性又は内因性であってもよい。ポリヌクレオチドは、無細胞環境に存在してもよい。ポリヌクレオチドは、遺伝子又はその断片であってもよい。ポリヌクレオチドは、DNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、RNAであってもよい。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してもよく、任意の機能を発揮してもよい。ポリヌクレオチドは、1つ以上の類似体（例えば、改変された骨格、糖、又は核酸塩基）を含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に付与されてもよい。アナログのいくつかの非限定的な例としては、5-ブロモウラシル、ペプチド核酸、異種核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コーディセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に結合したローダミン又はフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基アナログ、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、シュドウリジン、ジヒドロウリジン、クエオシン、及びワイオシンが挙げられる。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子又は遺伝子断片のコード又は非コード領域、結合分析から定義した遺伝子座（遺伝子座）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA（tRNA）、リボソームRNA（rRNA）、短い干渉RNA（siRNA）、短いヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、細胞を含まないDNA（cfDNA）及び細胞を含まないRNA（cfRNA）を含む細胞を含まないポリヌクレオチド、核酸プローブ、並びにプライマーが挙げられる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。

20

30

40

#### 【0425】

用語「トランスフェクション」又は「トランスフェクトされた」は、概して、非ウイルス又はウイルスベースの方法による細胞内への核酸の導入を指す。核酸分子は、完全なタンパク質又はその機能的部分をコードする遺伝子配列であってもよい。例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88を参照のこと。

#### 【0426】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書において互換

50

的に使用され、概して、ペプチド結合によって結合された少なくとも2つのアミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、ポリマーの特定の長さを意味しておらず、ペプチドが組換え技術、化学若しくは酵素合成を使用して産生されるか、又は天然に存在するかを暗示又は区別することを意図するものではない。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー並びに少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むアミノ酸ポリマーに適用する。ある場合では、ポリマーは、非アミノ酸によって中断されてもよい。用語は、全長タンパク質、及び2次又は3次構造を有するか又は有さないタンパク質（例えば、ドメイン）を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を含む。用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質形成、アセチル化、リン酸化、酸化、及び標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作によって修飾されたアミノ酸ポリマーを包含する。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」及び「複数のアミノ酸」という用語は、概して、修飾アミノ酸及びアミノ酸類似体を含むが、これに限定されない天然及び非天然アミノ酸を指す。修飾アミノ酸は、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸を含んでもよく、これは、アミノ酸上に天然に存在しない基又は化学的部分を含むように化学的に修飾されている。アミノ酸類似体は、アミノ酸誘導体を指す場合がある。用語「アミノ酸」は、D-アミノ酸とL-アミノ酸の両方を含む。

10

#### 【0427】

本明細書で使用される場合、「非天然」は、概して、天然の核酸又はタンパク質に見出されない核酸又はポリペプチド配列を指すことができる。非天然は、親和性タグを指してもよい。非天然は、融合物を指してもよい。非天然は、変異、挿入、又は欠失を含む、天然に存在する核酸又はポリペプチド配列を指してもよい。非天然配列は、非天然配列が融合される核酸配列又はポリペプチド配列によっても呈され得る活性（例えば、酵素活性、メチルトランスフェラーゼ活性、アセチルトランスフェラーゼ活性、キナーゼ活性、ユビキチン化活性など）を呈していてもよく、又はコードしてもよい。非天然核酸又はポリペプチド配列を、遺伝子操作によって天然に存在する核酸又はポリペプチド配列（若しくはそのバリエーション）に連結して、キメラ核酸又はポリペプチドをコードするキメラ核酸又はポリペプチド配列を生成してもよい。

20

#### 【0428】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」は、概して、遺伝子の転写又は発現を制御し、RNA転写が開始されるヌクレオチド又はヌクレオチドの領域に隣接するか、又は重複して位置し得る、調節DNA領域を指す。プロモーターは、しばしば転写因子と呼ばれるタンパク質因子に結合する特定のDNA配列を含有してもよく、これは、RNAポリメラーゼのDNAへの結合を促進して遺伝子転写をもたらす。「コアプロモーター」とも呼ばれる「基本プロモーター」は、概して、作動可能に連結されたポリヌクレオチドの転写発現を促進するための全ての基本要素を含有するプロモーターを指してもよい。真核生物の基本プロモーターは、TATA-ボックス及び／又はCAATボックスを含み得る。

30

#### 【0429】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、概して、核酸配列若しくはポリヌクレオチドがDNA鋳型から（例えば、mRNA若しくは他のRNA転写物に）転写されるプロセス、又は転写mRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。転写物及びコードされたポリペプチドは、「遺伝子産物」と総称され得る。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核生物の細胞におけるmRNAのスプライシングを含む。

40

#### 【0430】

本明細書において使用される場合、「作動可能に連結された」、「作動可能な連結」、「作動可能に連結された」、又はその文法的な均等物は、概して、遺伝子エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化配列などの並列化を指し、ここで、エレメントは、それらが予期される様式で作動することを可能にする関係にある。例えば、プロモーター配列又はエンハンサー配列を含み得る、調節エレメントは、調節エレメン

50

トが、コード配列の転写を開始するのを助ける場合、コード領域に作動可能に連結される。この機能的関係が維持される限り、制御エレメントとコード領域との間に介在する残基があってもよい。

#### 【0431】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、概して、ポリヌクレオチドを含むか、又はポリヌクレオチドと会合し、ポリヌクレオチドの細胞への送達を媒介するために使用され得る高分子又は高分子の会合を指す。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、リボソーム、及び他の遺伝子送達ビヒクルが挙げられる。ベクターは、概して、標的中の遺伝子の発現を促進するために遺伝子に作動可能に連結された、遺伝子エレメント、例えば、制御エレメントを含む。

10

#### 【0432】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」及び「核酸カセット」は、一緒に発現される又は発現のために作動可能に連結される核酸配列又はエレメントの組み合わせを指すために、一般に、互換的に使用される。いくつかの場合では、発現カセットは、発現のために作動可能に連結されている制御エレメントと遺伝子又は複数の遺伝子との組み合わせを指す。

#### 【0433】

DNA又はタンパク質配列の「機能的断片」は、概して、全長DNA又はタンパク質配列の生物学的活性と実質的に類似した生物学的活性（機能的又は構造的のいずれか）を保持する断片を指す。DNA配列の生物学的活性は、全長配列に起因する様式で発現に影響を与える能力であってもよい。

20

#### 【0434】

本明細書で使用される場合、「操作された」対象は、概して、対象がヒトの介入によって修飾されたことを示す。非限定的な実施例によれば、核酸は、その配列を、天然では生じない配列に改変することによって修飾されてもよく、核酸は、ライゲーションされた産物が、オリジナルの核酸に存在しない機能を有するように、天然では関連しない核酸にライゲーションすることによって修飾されてもよく、操作された核酸は、天然では存在しない配列を用いてインビトロで合成されてもよく、タンパク質は、天然では存在しない配列にそのアミノ酸配列を変更することによって修飾されてもよく、操作されたタンパク質は、新しい機能又は特性を獲得してもよい。「操作された」系は、少なくとも1つの操作された構成要素を含む。

30

#### 【0435】

本明細書において使用される場合、「合成」及び「人工」は、天然に存在するヒトタンパク質と低い配列同一性（例えば、50%未満の配列同一性、25%未満の配列同一性、10%未満の配列同一性、5%未満の配列同一性、1%未満の配列同一性）を有するタンパク質又はそのドメインを指すために互換的に使用される。例えば、VPRドメイン及びVP64ドメインは、合成トランス活性化ドメインである。

#### 【0436】

本明細書で使用される場合、用語「tracrRNA」又は「tracr配列」は、概して、野生型の例示的なtracrRNA配列（例えば、S. pyogenes S. aureusなど由来のtracrRNA、又は配列番号5476～5511）と少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、若しくは100%の配列同一性又は配列類似性を有する核酸を指すことができる。tracrRNAは、野生型の例示的なtracrRNA配列（例えば、S. pyogenes S. aureusなど由来のtracrRNAなど）と最大約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、若しくは100%の配列同一性又は配列類似性を有する核酸を指すことができる。tracrRNAは、欠失、挿入、若しくは置換、バリエーション、変異、又はキメラなどのヌクレオチドの変更を含み得るtracrRNAの修飾形態を指すことができる。tracrRNAは、少なくとも6つの連続するヌクレオチドのストレッチにわたって、野生型の例示的なtracr

40

50

RNA（例えば、*S. pyogenes* *S. aureus*など由来の *tracrRNA*）配列と少なくとも約60%同一であり得る核酸を指してもよい。例えば、*tracrRNA*配列は、少なくとも6つの連続するヌクレオチドの区画にわたって野生型の例となる *tracrRNA*（例えば、*S. pyogenes* *S. aureus*など由来の *tracrRNA*）配列と少なくとも約60%同一、少なくとも約65%同一、少なくとも約70%同一、少なくとも約75%同一、少なくとも約80%同一、少なくとも約85%同一、少なくとも約90%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約98%同一、少なくとも約99%同一、又は100%同一であり得る。タイプII *tracrRNA*配列は、隣接するCRISPRアレイ中のリピート配列の一部に対して相補性を有する領域を特定することによって、ゲノム配列上で予測することができる。

10

#### 【0437】

本明細書において使用される場合、「ガイド核酸」は、概して、別の核酸にハイブリダイズし得る核酸を指すことができる。ガイド核酸は、RNAであってもよい。ガイド核酸は、DNAであってもよい。ガイド核酸は、部位特異的に核酸の配列に結合するようにプログラムされてもよい。標的化されるべき核酸、又は標的核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。ガイド核酸は、ヌクレオチドを含んでもよい。標的核酸の一部は、ガイド核酸の一部に対して相補的であってもよい。ガイド核酸に相補的であり、ガイド核酸とハイブリダイズする二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖を、相補鎖と呼ぶことができる。相補鎖に相補的であり、それゆえ、ガイド核酸に相補的ではない二本鎖標的ポリヌクレオチドの鎖は、非相補鎖と呼ばれてもよい。ガイド核酸は、ポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「単一ガイド核酸」と呼ばれ得る。ガイド核酸は、2つのポリヌクレオチド鎖を含んでもよく、また「ダブルガイド核酸」と呼ばれ得る。そうでない場合、用語「ガイド核酸」は、単一ガイド核酸とダブルガイド核酸の両方を指す、包括的であってもよい。ガイド核酸は、「核酸標的化セグメント」又は「核酸標的化配列」と称され得るセグメントを含み得る。核酸標的化セグメントは、「タンパク質結合セグメント」又は「タンパク質結合配列」又は「Casタンパク質結合セグメント」と称され得るサブセグメントを含んでもよい。

20

#### 【0438】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈における用語「配列同一性」又は「同一性パーセント」は、概して、配列比較アルゴリズムを使用して測定された場合、局所比較ウィンドウ又はグローバル比較ウィンドウにわたって最大の一致のために比較及び整列されたとき、同一であるか、又は特定のパーセンテージの、同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドを有する、2つ（例えば、一対でのアライメントでの）又はそれ以上（例えば、複数の配列アライメントでの）の配列を指す。ポリペプチド配列に好適な配列比較アルゴリズムとしては、例えば、3のワード長（W）、10の期待値Iのパラメーター、及び11の存在、1の延長でギャップコストを設定しているBLOSUM62スコアリングマトリックスを使用し、かつ30残基より長いポリペプチド配列についての条件付き組成スコアマトリックス調整を使用したBLASTP、2のワード長（W）、1000000の期待値（E）のパラメーター、及びオープンギャップに対して9及び30残基より短い配列についての拡張ギャップに対して1でのPAM30スコアリング設定ギャップコストを使用したBLASTP（これらは、<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>で入手可能なBLASTスイートにおけるBLASTPについてのデフォルトのパラメーターである）、2の一致、-1のミスマッチ、及び-1のギャップのパラメーターを用いたSmith-Waterman相同性検索アルゴリズム、のパラメーターを用いたCLUSTALW、デフォルトパラメーターを用いたMUSCLE、パラメーター、2のリツリー（retree）及び1000の最大反復（max iteration）を用いたMAFFT、デフォルトパラメーターを用いたNovafold、デフォルトパラメーターを用いたHMMER `hmmalign`が挙げられる。

30

40

#### 【0439】

1つ以上の保存的アミノ酸置換を有する本明細書に記載される酵素のうちのいずれかの

50

バリエーションが、本開示に含まれる。こうした保存的置換は、ポリペプチドの三次元構造又は機能を破壊することなく、ポリペプチドのアミノ酸配列においてなされ得る。保存的置換は、アミノ酸を、互いに同様の疎水性、極性、及びR鎖長で置換することによって達成することができる。加えて、又は代わりに、異なる種由来の相同なタンパク質の整列した配列を比較することによって、コードされるタンパク質の基本的な機能を変化させることなく、種間で変異したアミノ酸残基（例えば、非保存残基）を特定することによって保存的置換を特定することができる。このような保存的に置換されたバリエーションは、本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼタンパク質配列（例えば、本明細書に記載されるMG1、MG2、MG3、MG3a、MG3b、MG4、MG5、MG6、MG7、MG14、MG15、MG16、MG17、MG18、MG21、MG22、MG23、MG24、MG25、MG38、MG40、MG41、MG42、MG43、MG44、MG46、MG47、MG48、MG49、MG50、MG51、MG52、MG71、MG72、MG73、MG74、MG86、MG87、MG88、MG89、MG94、MG95、MG96、MG97、MG98、MG99、MG100、MG111、MG112、MG116、MG123、MG124、MG125、又はMG150ファミリーエンドヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つと少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の同一性を有するバリエーションを含み得る。いくつかの実施形態では、このような保存的に置換されたバリエーションは、機能的バリエーションである。こうした機能的バリエーションは、エンドヌクレアーゼの重要な活性部位残基の活性が破壊されないように、置換を有する配列を包含することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるタンパク質のうちのいずれかの機能的バリエーションは、少なくとも1つの保存残基又は機能的残基の置換を欠いている。

10

20

40

50

#### 【0440】

機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的置換表は、様々な参考文献から入手可能である（例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co., 2nd edition (December 1993))を参照されたい）。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：

30

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)、
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)、
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)、及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

#### 【0441】

1つ以上の置換を有する本明細書に記載される核酸配列のうちのいずれかのバリエーションが、本開示に含まれる。そのようなバリエーションには、本明細書に記載される核酸配列うちのいずれか1つと少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有するバリエーションが含まれ得る。

#### 【0442】

本明細書において使用される場合、用語「RuvC\_\_IIIDメイン」は、概して、R

uvCエンドヌクレアーゼドメインの第3の不連続セグメントを指す(RuvCヌクレアーゼドメインは、3つの不連続セグメントであるRuvC\_I、RuvC\_II、及びRuvC\_IIIから構成される)。RuvCドメイン又はそのセグメントは、概して、文書化されているドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されているドメイン配列(例えば、RuvC\_IIIのPfam HMM PF18541)に基づいて構築された隠れマルコフモデル(HMM)との比較によって特定することができる。

#### 【0443】

本明細書において使用される場合、用語「HNHドメイン」は、概して、特徴的なヒスチジン残基及びアスパラギン残基を有するエンドヌクレアーゼドメインを指す。HNHドメインは、概して、文書化されているドメイン配列へのアライメント、注釈付きドメインを有するタンパク質への構造的アライメント、又は文書化されているドメイン配列(例えば、ドメインHNHのPfam HMM PF01844)に基づいて構築された隠れマルコフモデル(HMM)との比較によって特定することができる。

#### 【0444】

##### 概要

#### 【0445】

独自の機能性及び構造を有する新しいCas酵素の発見は、デオキシリボ核酸(DNA)編集技術を更に破壊して、速度、特異性、機能性、及び使いやすさを改善する可能性を提供し得る。微生物におけるクラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復(CRISPR)系の予測される保有率及び微生物種の純多様性と比較して、比較的少数の機能的に特徴付けられたCRISPR/Cas酵素が、文献に存在する。これは、一部、実験室条件下では、膨大な数の微生物種が容易には培養されないためである。多数の微生物種を表す天然の環境ニッチからのメタゲノムシーケンシングは、文書化された新しいCRISPR/Cas系の数を劇的に増加させ、新しいオリゴヌクレオチド編集機能の発見を早める可能性を付与する可能性がある。このようなアプローチの実りのある最近の例は、天然微生物群集のメタゲノム分析からのCasX/CasY CRISPR系の2016年の発見によって示される。

#### 【0446】

CRISPR/Cas系は、微生物における適応免疫系として機能すると記載されているRNA指向性ヌクレアーゼ複合体である。それらの自然な状況では、CRISPR/Cas系は、CRISPR(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列反復)オペロン又は遺伝子座において生じ、これは概して、2つの部分:(i)RNAベースの標的化エレメントをコードする、同等に短いスペーサー配列によって分けられた短い反復配列(30~40bp)のアレイ、及び(ii)アクセサリタンパク質/酵素と並んだRNAベースの標的化エレメントによって指示されるヌクレアーゼポリペプチドをコードするCasをコードするORFを含む。特定の標的核酸配列の効率的なヌクレアーゼ標的化は、概して、(i)標的(標的シード)の最初の6~8個の核酸とcrRNAガイドとの間の相補的なハイブリダイゼーション、及び(ii)標的シードの画定された近傍内のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列の存在の両方を必要とする(PAMは、通常、宿主ゲノム内に一般的に表されない配列である)。系の正確な機能及び構成に応じて、CRISPR-Cas系は、共有された機能的特徴及び進化的類似性に基づき、2つのクラス、5つのタイプ、及び16のサブタイプに一般的に構成されている。

#### 【0447】

クラスI CRISPR-Cas系は、大型の複数サブユニットエフェクター複合体を有し、タイプI、III、及びIVを含む。

#### 【0448】

タイプI CRISPR-Cas系は、構成要素の面で中程度の複雑さとみなされる。タイプI CRISPR-Cas系では、RNA標的化エレメントのアレイは、リピートエレメントで処理される長い前駆crRNA(プレcrRNA)として転写されて、ヌク

レアーゼ複合体を核酸標的に配向させる短い成熟 *crRNA* が、その後、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) と呼ばれる適切な短いコンセンサス配列に引き続いて放出される。このプロセッシングは、カスケードと呼ばれる大きなエンドヌクレアーゼ複合体のエンドリボヌクレアーゼサブユニット (Cas6) を介して生じ、これは、*crRNA* 指向性ヌクレアーゼ複合体のヌクレアーゼ (Cas3) タンパク質成分も含む。Cas I ヌクレアーゼは、主に DNA ヌクレアーゼとして機能する。

【0449】

タイプ I II CRISPR系は、Csm又はCmrタンパク質サブユニットを含む復関連ミステリアスタンパク質 (RAMP) とともに、Cas10として知られる中心ヌクレアーゼの存在によって特徴付けられ得る。タイプ I の系と同様、成熟 *crRNA* は、Cas6様酵素を使用してプレ*crRNA* から処理される。タイプ I 及び II の系とは異なり、タイプ I II の系は、DNA-RNA二本鎖 (RNAポリメラーゼの鋳型として使用されるDNA鎖など) を標的化し、開裂するようである。

10

【0450】

タイプ I V CRISPR-Cas系は、高度に還元された大きなサブユニットヌクレアーゼ (csf1)、Cas5 (csf3) 及びCas7 (csf2) 群のRAMPタンパク質の2つの遺伝子、並びにある場合では、予測される小さいサブユニットの遺伝子からなるエフェクター複合体を有し、そのような系は、内因性プラスミドに一般的に存在する。

【0451】

クラス I II CRISPR-Cas系は一般に、単一ポリペプチドマルチドメインヌクレアーゼエフェクターを有し、タイプ I I、V 及び V I を含む。

20

【0452】

タイプ I II CRISPR-Cas系は、構成要素の点で最も単純なものとみなされる。タイプ I II CRISPR-Cas系では、CRISPRアレイを成熟 *crRNA* にプロセッシングすることは、特別なエンドヌクレアーゼサブユニットの存在を必要としないが、むしろ、アレイリピート配列に相補的な領域を有する小さなトランスコード *crRNA* (tracrRNA) であり、tracrRNAは、その対応するエフェクターヌクレアーゼ (例えば、Cas9) 及びリピート配列の両方と相互作用して、前駆 dsRNA 構造を形成し、tracrRNA と *crRNA* の両方を負荷した成熟エフェクター酵素を生成するために、内因性 RNase I II によって切断される。Cas I II ヌクレアーゼは、DNA ヌクレアーゼとして知られている。タイプ 2 エフェクターは一般に、RuvC様ヌクレアーゼドメインのフォールドに挿入された無関係なHNHヌクレアーゼドメインを有するRNase Hフォールドに適合するRuvC様エンドヌクレアーゼドメインからなる構造を呈する。RuvC様ドメインは、標的 (例えば、*crRNA* 相補的) DNA鎖の切断に関与し、一方、HNHドメインは、置換DNA鎖の切断に関与する。

30

【0453】

V型CRISPR-Cas系は、RuvC様ドメインを含む、タイプ I II エフェクターの構造と類似したヌクレアーゼエフェクター (例えば、Cas12) 構造によって特徴付けられる。タイプ I II と同様に、ほとんどの (全てではない) タイプ V CRISPR系は、tracrRNAを使用して、プレ*crRNA* を成熟 *crRNA* に処理するが、プレ*crRNA* を複数の *crRNA* に切断するためのRNase I II を必要とするタイプ I II の系とは異なり、タイプ V の系は、エフェクターヌクレアーゼ自体を使用してプレ*crRNA* を切断することができる。タイプ I II CRISPR-Cas系と同様に、タイプ V CRISPR-Cas系は、DNA ヌクレアーゼとして知られている。タイプ I II CRISPR-Cas系とは異なり、一部のタイプ V 酵素 (例えば、Cas12a) は、二本鎖標的配列の第一の *crRNA* 指向切断によって活性化される、強固な一本鎖非特異的デオキシリボヌクレアーゼ活性を有するようである。

40

【0454】

タイプ V I CRIPSR-Cas系は、RNAガイドRNAエンドヌクレアーゼを有

50

する。RuvC様ドメインの代わりに、タイプVI系の単一ポリペプチドエフェクター（例えば、Cas13）は、2つのHEPNリボヌクレアーゼドメインを含む。タイプII及びV系の両方とは異なり、タイプVI系はまた、プレcrRNAをcrRNAにプロセシングするためtracrRNAを必要としないように思われる。しかしながら、タイプV系と同様に、一部のタイプVI系（例えば、C2C2）は、最初のcrRNAによる標的RNAの切断によって活性化される、頑強な一本鎖非特異的ヌクレアーゼ（リボヌクレアーゼ）活性を有するようである。

【0455】

クラスII CRISPR-Casは、より単純な構築物であるため、設計ヌクレアーゼ／ゲノム編集適用としての操作及び開発に最も広く適用されてきた。

10

【0456】

インビトロ使用のためのこのような系の早期適用のうちの1つは、Jinekら（Science, 2012 Aug 17, 337 (6096): 816-21、参照により本明細書に完全に組み込まれる）において見ることができる。Jinekの試験では、最初に（i）S. pyogenes SF370から単離した、組換え発現した、精製された全長Cas9（例えば、クラスII、タイプII Cas酵素）、（ii）切断されることが望まれる標的DNA配列に相補的な約20ntの5'配列、その後3' tracr結合配列が続く、精製された成熟約42ntのcrRNA（crRNA全体は、T7プロモーター配列を担持する合成DNA鋳型からインビトロで転写される）、（iii）T7プロモーター配列を担持する合成DNA鋳型からインビトロで転写された精製tracrRNA、及び（iv）Mg<sup>2+</sup>が関与する系を記載した。Jinekは後に、（ii）のcrRNAが、リンカー（例えば、GAAA）によって（iii）の5'末端に結合されて、それ自体で標的にCas9を誘導することができる単一の融合合成ガイドRNA（sgRNA）を形成する、改良された操作された系を記載した。

20

【0457】

参照により本明細書に完全に組み込まれる、Maliら（Science, 2013 Feb 15, 339 (6121): 823-826.）は、後に、（i）C末端核局在化配列（例えば、SV40 NLS）及び適当なポリアデニル化シグナル（例えば、TKpAシグナル）を有する適当な哺乳類プロモーター下でコドン最適化Cas9（例えば、クラスII、タイプII Cas酵素）をコードするORF、並びに（ii）適当なポリメラーゼIIIプロモーター（例えば、U6プロモーター）下でsgRNA（Gで始まる5'配列、続いて3' tracr結合配列、リンカー、及びtracrRNA配列に結合した20ntの相補的標的化核酸配列を有する）をコードするORF、をコードするDNAベクターをもたらすことによって、この系を哺乳類細胞での使用に適合させた。

30

【0458】

MG酵素

一態様では、本開示は、メタゲノムシーケンシングを介して発見された操作されたヌクレアーゼ系を提供する。ある場合では、メタゲノムシーケンシングは、試料に対し実施される。ある場合には、試料は、様々な環境から収集され得る。そのような環境は、ヒトマイクロバイオーム、動物マイクロバイオーム、高温環境、低温環境であり得る。そのような環境は、堆積物を含み得る。

40

【0459】

MG3酵素

一態様では、本開示は、（a）エンドヌクレアーゼを含む操作されたヌクレアーゼ系を提供する。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼである。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、タイプII、クラスII Casエンドヌクレアーゼである。エンドヌクレアーゼは、RuvC\_\_IIドメインを含んでもよく、当該RuvC\_\_IIドメインは、配列番号2242～2251のうちのいずれか1つと少なくとも約70%の配列同一性を有する。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、RuvC\_\_IIドメインを含み得、RuvC\_\_IIドメインは、配列番号2242～2251のう

50

ちのいずれか1つと少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の同一性を有し得る。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、R u v C \_ I I I ドメインを含み得、配列番号2242~2251のうちのいずれか1つと実質的に同一であってもよい。エンドヌクレアーゼは、配列番号2242~2244のうちのいずれか1つと少なくとも約70%の配列同一性を有するR u v C \_ I I I ドメインを含み得る。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2242~2244のうちのいずれか1つと少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の同一性を有するR u v C \_ I I I ドメインを含み得る。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号2242~2244のうちのいずれか1つと実質的に同一であるR u v C \_ I I I ドメインを含み得る。

10

20

#### 【0460】

エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4066のうちのいずれか1つと少なくとも約70%の同一性を有するH N H ドメインを含み得る。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4066のうちのいずれか1つと少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%同一であるH N H ドメインを含み得る。エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4066のうちのいずれか1つと実質的に同一であるH N H ドメインを含み得る。エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4058のうちのいずれか1つと少なくとも約70%の同一性を有するH N H ドメインを含み得る。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4058のうちのいずれか1つと少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%同一であるH N H ドメインを含み得る。エンドヌクレアーゼは、配列番号4056~4058のうちのいずれか1つと実質的に同一であるH N H ドメインを含み得る。

30

#### 【0461】

ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有するバリエーションを含み得る。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、配列番号421~431のうちのいずれか1つと実質的に同一であってもよい。ある場合では、エンドヌクレアーゼは、配列番号421~423のうちのいずれか1つと少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも

40

50

約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、又は少なくとも約 99%の同一性を有するバリエーションを含み得る。ある場合には、エンドヌクレアーゼは、配列番号 421 ~ 423 のうちのいずれか 1つと実質的に同一であってもよい。

#### 【0462】

ある場合には、エンドヌクレアーゼは、1つ以上の核局在化配列 (NLS) を有するバリエーションを含み得る。NLS は、当該エンドヌクレアーゼの N 末端又は C 末端の近位であってもよい。NLS は、配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1つに対して、又は配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1つと少なくとも約 30%、少なくとも約 35%、少なくとも約 40%、少なくとも約 45%、少なくとも約 50%、少なくとも約 55%、少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、若しくは少なくとも約 99%の同一性を有するバリエーションに対して N 末端又は C 末端に付加され得る。NLS は、SV40 ラージ T 抗原 NLS であってもよい。NLS は、c-myc NLS であってもよい。NLS は、配列番号 5593 ~ 5608 のうちのいずれか 1つと少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 99%の同一性を有する配列を含み得る。NLS は、配列番号 5593 ~ 5608 のうちのいずれか 1つと実質的に同一である配列を含み得る。

#### 【0463】

ある場合では、配列同一性は、BLASTP、CLUSTALW、MUSCLE、MAFFT、Novafold、又は Smith-Waterman 相溶性検索アルゴリズムパラメーターを用いた CLUSTALW アルゴリズムによって決定され得る。配列同一性は、3 のワード長 (W)、10 の期待値 (E) のパラメーターを使用し、及び 11 の存在、1 の延長でギャップコストを設定している BLOSUM62 スコアリングマトリックスを使用し、条件付き組成スコアマトリックス調整を使用する、BLASTP アルゴリズムによって決定され得る。

#### 【0464】

ある場合では、上記の系は、(b) 所望の切断配列に相補的な 5' 標的化領域を有するエンドヌクレアーゼと複合体を形成することができる少なくとも 1つの操作された合成ガイドリボ核酸 (sgRNA) を含み得る。ある場合では、5' 標的化領域は、エンドヌクレアーゼと適合する PAM 配列を含み得る。ある場合では、標的化領域の最も 5' 側のヌクレオチドは G であってもよい。ある場合では、5' 標的化領域は、15 ~ 23 ヌクレオチド長であってもよい。ガイド配列及び tracr 配列は、別個のリボ核酸 (RNA) 又は単一のリボ核酸 (RNA) として供給され得る。ガイド RNA は、標的化領域の 3' 側に crRNA tracrRNA 結合配列を含み得る。ガイド RNA は、crRNA tracrRNA 結合領域の 3' 側に 4 ヌクレオチドリンカーが先行する tracrRNA 配列を含み得る。sgRNA は、5' から 3' の方向に、細胞内の標的配列にハイブリダイズすることができる非天然ガイド核酸配列と、tracr 配列と、を含み得る。ある場合では、非天然ガイド核酸配列及び tracr 配列は、共有結合している。

#### 【0465】

ある場合では、tracr 配列は、特定の配列を有してもよい。tracr 配列は、天然 tracrRNA 配列の少なくとも約 60 ~ 100 個 (例えば、少なくとも約 60 個、少なくとも約 65 個、少なくとも約 70 個、少なくとも約 75 個、少なくとも約 80 個、少なくとも約 85 個、又は少なくとも約 90 個) の連続するヌクレオチドの少なくとも約 80% を有し得る。tracr 配列は、配列番号 5495 ~ 5502 のうちのいずれか 1つの少なくとも約 60 ~ 100 個 (例えば、少なくとも約 60 個、少なくとも約 65 個、少なくとも約 70 個、少なくとも約 75 個、少なくとも約 80 個、少なくとも約 85 個、又は少なくとも約 90 個) の連続するヌクレオチドと少なくとも約 80% の配列同一性を有し得る。ある場合では、tracrRNA は、配列番号 5495 ~ 5502 のうちのい

ずれか1つの少なくとも約60～90個（例えば、少なくとも約60個、少なくとも約65個、少なくとも約70個、少なくとも約75個、少なくとも約80個、少なくとも約85個、又は少なくとも約90個）の連続するヌクレオチドと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の同一性を有し得る。ある場合では、tracrRNAは、配列番号5495～5502のうちのいずれか1つの少なくとも約60～100個（例えば、少なくとも約60個、少なくとも約65個、少なくとも約70個、少なくとも約75個、少なくとも約80個、少なくとも約85個、又は少なくとも約90個）の連続するヌクレオチドと実質的に同一であってもよい。tracrRNAは、配列番号5495～5502のうちのいずれかを含み得る。

10

#### 【0466】

ある場合では、エンドヌクレアーゼと複合体を形成することができる少なくとも1つの操作された合成ガイドリボ核酸（sgRNA）は、配列番号5466～5467のうちのいずれか1つと少なくとも約80%の同一性を有する配列を含み得る。sgRNAは、配列番号5466～5467のうちのいずれか1つと少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、又は少なくとも約99%の同一性を有する配列を含み得る。sgRNAは、配列番号5466～5467のうちのいずれか1つと実質的に同一である配列を含み得る。

20

#### 【0467】

ある場合では、上記の系は、標的DNA遺伝子座での切断のための第1の領域及び第2の領域を標的とする2つの異なるsgRNAを含んでもよく、第2の領域は、第1の領域の3'側である。ある場合では、上記の系は、5'から3'の方向に：第1の領域に対して5'側に少なくとも約20（例えば、少なくとも約40、80、120、150、200、300、500、又は1kb）ヌクレオチドの配列を含む第1の相同アーム、少なくとも約10ヌクレオチドの合成DNA配列、及び第2の領域に対して3'側に少なくとも約20（例えば、少なくとも約40、80、120、150、200、300、500、又は1kb）ヌクレオチドの配列を含む第2の相同アームを含む、一本鎖又は二本鎖DNA修復鋳型を含み得る。

30

#### 【0468】

一態様では、本開示は、対象となる標的核酸遺伝子座を修飾する方法を提供する。方法は、酵素及び本明細書に開示される少なくとも1つの合成ガイドRNA（sgRNA）を含む、本明細書に開示される非天然系のうちのいずれかを標的核酸遺伝子座に送達することを含み得る。酵素は、少なくとも1つのsgRNAと複合体を形成することができ、複合体が対象の標的核酸遺伝子座に結合されると、対象の標的核酸遺伝子座を修飾することができる。酵素を当該遺伝子座に送達することは、系又は系をコードする核酸を用いて細胞をトランスフェクトすることを含み得る。ヌクレアーゼを当該遺伝子座に送達することは、系又は系をコードする核酸を用いて細胞をエレクトロポレーションすることを含み得る。ヌクレアーゼを当該遺伝子座に送達することは、対象の遺伝子座を含む核酸と、緩衝液中で系をインキュベートすることを含み得る。ある場合では、標的核酸遺伝子座は、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）を含む。標的核酸遺伝子座は、ゲノムDNA、ウイルスDNA、ウイルスRNA、又は細菌DNAを含み得る。標的核酸遺伝子座は、細胞内にあり得る。標的核酸遺伝子座は、インビトロであってもよい。標的核酸遺伝子座は、真核細胞内又は原核細胞内であってもよい。細胞は、動物細胞、ヒト細胞、細菌細胞、古細菌細胞、又は植物細胞であってもよい。酵素は、対象の標的遺伝子座で、又は標的遺伝子座の近位に、一本鎖又は二本鎖の切断を誘導し得る。

40

#### 【0469】

標的核酸遺伝子座が細胞内であり得る場合、酵素は、配列番号2242～2251のう

50

ちのいずれか1つと少なくとも約75%（例えば、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%）の同一性を有するRuvC—I I Iドメインを有する酵素をコードするオープンリーディングフレームを含有する核酸として供給され得る。当該エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームを含有するデオキシリボ核酸（DNA）は、配列番号5578～5580のうちのいずれかと実質的に同一である配列、又は配列番号5578～5580のうちのいずれか1つと少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、若しくは少なくとも約99%の同一性を有するバリエーションの配列を含み得る。ある場合では、核酸は、エンドヌクレアーゼをコードするオープンリーディングフレームが作動可能に連結されているプロモーターを含む。プロモーターは、CMV、EF1a、SV40、PGK1、Ubc、ヒトベータアクチン、CAG、TRE、又はCaMKIIaプロモーターであってもよい。エンドヌクレアーゼは、当該エンドヌクレアーゼをコードする当該オープンリーディングフレームを含有するキャッピングされたmRNAとして供給されてもよい。エンドヌクレアーゼは、翻訳されたポリペプチドとして供給され得る。少なくとも1つの操作されたsgRNAは、リボ核酸（RNA）pol I I Iプロモーターに作動可能に連結された当該少なくとも1つの操作されたsgRNAをコードする遺伝子配列を含有するデオキシリボ核酸（DNA）として供給され得る。ある場合では、生物は、真核生物であり得る。ある場合では、生物は、真菌であり得る。ある場合では、生物は、ヒトであり得る。

10

20

30

40

50

#### 【0470】

本開示の系は、例えば、核酸編集（例えば、遺伝子編集）、核酸分子への結合（例えば、配列特異的結合）、などの様々な用途に使用され得る。このような系は、例えば、対象において疾患を引き起こす可能性のある遺伝的に受け継がれた変異に対処する（例えば、除去又は置換する）ため、細胞におけるその機能を確認するために遺伝子を不活性化するため、疾患を引き起こす遺伝子エレメントを検出する診断ツールとして（例えば、逆転写されたウイルスRNA若しくは疾患を引き起こす変異をコードする増幅されたDNA配列の切断を介して）、特定のヌクレオチド配列（例えば、細菌内の抗生物質耐性をコードする配列）を標的とするためのプローブと組み合わせた不活性化した酵素として、ウイルスゲノムを標的化することによってウイルスを不活性化するか、若しくは宿主細胞に感染できないようにするため、価値ある低分子、高分子、若しくは二次代謝産物を生じるように生物を操作するための遺伝子を加えるか、若しくは代謝経路を修正するため、進化的選択のための遺伝子駆動エレメントを確立するため、バイオセンサーとして外来低分子及びヌクレオチドによる細胞の摂動を検出するため使用され得る。

#### 【実施例】

#### 【0471】

#### 実施例1—新規タンパク質のメタゲノム分析

メタゲノム試料を、堆積物、土壌及び動物から採取した。デオキシリボ核酸（DNA）を、ZymoBionomics DNAミニプレップキットを用いて抽出し、Illumina HiSeq（登録商標）2500でシーケンシングした。試料を、所有者の同意を得て収集した。公的情報源からの更なる生配列データには、動物マイクロバイオーム、堆積物、土壌、温泉、熱水噴出孔、海洋、泥炭地、永久凍土層、及び下水の配列が含まれていた。新しいCasエフェクターを特定するために、タイプII Casエフェクタータンパク質を含む文書化されているCasタンパク質配列に基づいて生成された隠れマルコフモデルを使用して、メタゲノム配列データを検索した。検索によって特定した新規エフェクタータンパク質を、文書化されているタンパク質に対して整列させて、可能性のある活性部位を特定した。このメタゲノムワークフローにより、本明細書に記載されるクラス

II、タイプII CRISPRエンドヌクレアーゼのファミリーの描写がもたらされた。  
【0472】

実施例2－（一般的なプロトコル）本明細書に記載されるエンドヌクレアーゼのPAM配列特定／確認

PAM配列を、*E. coli*溶解物ベースの発現系（myTXTL、Arbor Biosciences）で発現させた推定エンドヌクレアーゼによって切断され得るランダムに生成したPAM配列を含有するプラスミドをシーケンシングすることによって決定した。この系において、*E. coli*コドン最適化ヌクレオチド配列を、T7プロモーターの制御下でPCR断片から転写し、翻訳した。T7プロモーター下のtracr配列を有する第二のPCR断片及びT7プロモーターとそれに続く反復スペーサー反復配列から構成される最小CRISPRアレイを、同じ反応で転写した。TXTL系におけるエンドヌクレアーゼ配列及びtracr配列の発現に成功し、続いてCRISPRアレイ処理により、活性なインビトロCRISPRヌクレアーゼ複合体を得た。

10

【0473】

最小アレイ中のそれと一致するスペーサー配列、続いて8N混合塩基（推定PAM配列）を含有する標的プラスミドのライブラリーを、TXTL反応の生成物とともにインキュベートした。1～3時間後、反応を停止し、DNAクリーンアップキット、例えば、Zymo DCC、AMPure XPビーズ、QiaQuickなどを介してDNAを回収した。アダプター配列を、エンドヌクレアーゼによって切断された活性なPAM配列を有するDNAに平滑末端ライゲーションしたが、切断されなかったDNAは、ライゲーションにはアクセスできなかった。次いで、活性PAM配列を含むDNAセグメントを、ライブラリー及びアダプター配列に特異的なプライマーを用いてPCRにより増幅した。PCR増幅産物をゲル上で分解して、切断事象に対応するアンプリコンを同定した。切断反応の増幅したセグメントも、NGSライブラリーの調製のための鋳型として使用した。開始8Nライブラリーのサブセットであるこの得られたライブラリーをシーケンシングすることにより、活性CRISPR複合体についての正しいPAMを含む配列を明らかにした。単一のRNA構築物を用いたPAM試験については、インビトロで転写されたRNAをプラスミドライブラリーとともに加え、tracr／最小CRISPRアレイ鋳型を省略したことを除いて、同じ手順を繰り返した。NGSライブラリーを調製したエンドヌクレアーゼについては、seqLogo（例えば、Huber et al. Nat Methods. 2015 Feb, 12（2）：115－21を参照されたい）表示を構築した。これらの表示を構築するために使用されるseqLogoモジュールは、DNA配列モチーフ（例えば、PAM配列）の位置重み行列を取得し、Schneider及びStephens（例えば、Schneider et al. Nucleic Acids Res. 1990 Oct 25, 18（20）：6097－100を参照されたい、によって導入された、対応する配列ロゴをプロットする。seqLogo表示の配列を表す文字は、整列した配列（例えば、PAM配列）の各位置について互いの上に積み重ねられる。各文字の高さはその頻度に比例し、最も一般的な文字が一番上にあるように、文字を並べ替えている。

20

30

【0474】

実施例3－（一般的なプロトコル）tracrRNA構造及びsgRNA構造のRNAフォールディング

40

Andronescu et al. Bioinformatics. 2007 Jul 1, 23（13）：i19－28（これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）の方法を使用して、37℃でのガイドRNA配列の折り畳み構造を計算した。

【0475】

実施例4－（一般的なプロトコル）MG CRISPR複合体のインビトロ切断効率

エンドヌクレアーゼは、プロテアーゼ欠損*E. coli* B株における誘導性T7プロモーターからのHisタグ付き融合タンパク質として発現された。Hisタグ付きタンパク質を発現している細胞を超音波処理によって溶解し、Hisタグ付きタンパク質を、A

50

KTA Avant FPLC (GE Lifescience) 上の HisTrap FF カラム (GE Lifescience) での Ni-NTA 親和性クロマトグラフィーによって精製した。溶出液をアクリルアミドゲル (Bio-Rad) 上の SDS-PAGE によって分離し、Instant Blue Ultrafast coomassie (Sigma-Aldrich) で染色した。純度を、ImageLab ソフトウェア (Bio-Rad) を用いたタンパク質バンドの濃度測定法を使用して決定した。精製したエンドヌクレアーゼを、50 mM Tris-HCl、300 mM NaCl、1 mM TCEP、5% グリセロールからなる保存緩衝液、pH 7.5 に透析し、-80°C で保存した。

#### 【0476】

スパーサー配列及び PAM 配列 (例えば、実施例 2 で決定した) を含有する標的 DNA を、DNA 合成によって構築した。PAM が縮重塩基を有する場合、試験のために単一の代表的な PAM が選択された。標的 DNA は、一端から 700 bp に配置した PAM 及びスパーサーを用いる PCR 増幅を介してプラスミドに由来する 2200 bp の直鎖 DNA を含んでいた。切断の成功は、700 及び 1500 bp の断片をもたらした。標的 DNA、インビトロ転写された単一 RNA、及び精製した組換えタンパク質を、過剰なタンパク質及び RNA を含む切断緩衝液 (10 mM のトリス、100 mM の NaCl、10 mM の MgCl<sub>2</sub>) 中で組み合わせ、5 分〜3 時間、通常は 1 時間インキュベートした。反応を、RNAse A の添加及び 60 分のインキュベーションを介して停止させた。次いで、反応物を 1.2% TAE アガロースゲル上で分離し、切断した標的 DNA の画分を ImageLab ソフトウェアで定量化した。

#### 【0477】

実施例 5 - (一般的なプロトコル) E. coli における MG CRISPR 複合体のゲノム切断活性の試験

E. coli は、二本鎖 DNA 切断を効率的に修復する能力を欠く。したがって、ゲノム DNA の切断は、致命的な事象であり得る。この現象を利用して、スパーサー／標的配列及び PAM 配列がそのゲノム DNA に組み込まれた標的株においてエンドヌクレアーゼ及び tracrRNA を組換え発現させることによって、E. coli でエンドヌクレアーゼ活性を試験した。

#### 【0478】

このアッセイでは、PAM 配列は、実施例 2 に記載した方法によって決定されるように、試験されるエンドヌクレアーゼに特異的である。sgRNA 配列を、tracrRNA の配列及び予測構造に基づいて決定した。リピートの 5' 末端から開始する、8〜12 bp (通常 10 bp) のリピート-アンチリピート対を選択した。リピートの残りの 3' 末端及び tracrRNA の 5' 末端を、テトラループで置換した。一般に、テトラループは GAAA であったが、特に、GAAA 配列がフォールディングに干渉すると予測される場合、他のテトラループを使用することができる。これらの場合、TTCG テトラループを使用した。

#### 【0479】

ゲノム DNA に組み込まれた PAM 配列を有する操作された株を、エンドヌクレアーゼをコードする DNA で形質転換した。次いで、形質転換体を、化学コンピテントにし、標的配列に特異的 (「オンターゲット」)、又は標的に非特異的 (「非標的」) のいずれかの 50 ng の単一ガイド RNA で形質転換した。ヒートショック後、形質転換を、SOC 中、37°C で 2 時間かけて回収した。次いで、ヌクレアーゼ効率を、誘導培地上で増殖させた 5 倍希釈系列によって決定した。コロニーを、3 つ組で希釈系列から定量化した。

#### 【0480】

実施例 6 a - (一般的なプロトコル) 哺乳類細胞における MG Cas エフェクタータンパク質配列を、2 つの哺乳類発現ベクター: (a) C 末端の SV40 NLS 及び 2 A -

10

20

30

40

50

GFPタグを有するもの、(b) GFPタグを有さず、2つのSV40 NLS配列を有し、1つはN末端上に、1つはC末端上にあるもの、で試験した。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を、哺乳類細胞における発現のためにコドン最適化する。

#### 【0481】

標的化配列を付加した対応する単一ガイドRNA配列(sgRNA)を、第2の哺乳類発現ベクターにクローニングする。2つのプラスミドをHEK293T細胞に共トランスフェクトする。発現プラスミドとsgRNA標的化プラスミドをHEK293T細胞に共トランスフェクションしてから72時間後、DNAを抽出し、NGSライブラリーの調製に使用する。NHEJの割合を標的部位のシーケンシングにおけるインデルを介して測定して、哺乳類細胞における酵素の標的化効率を示す。各タンパク質の活性を試験するために、少なくとも10個の異なる標的部位を選択した。

#### 【0482】

実施例6b-(一般的なプロトコル) 哺乳類細胞におけるMG-CRISPR複合体のゲノム切断活性の試験

哺乳類細胞における標的化及び切断活性を示すために、MG-Casエフェクタータンパク質配列を、2つの哺乳類発現ベクター：(a) N末端及びC末端に隣接するSV40 NLS配列、C末端Hisタグ、及びHisタグ後のC末端に2A-GFPタグを有するもの(骨格1)、(b) 隣接するNLS配列とC末端Hisタグは有するが、T2A-GFPタグは有さないもの(骨格2)にクローニングした。いくつかの場合では、エンドヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列を、E. coli細胞における発現のためにコドン最適化されたか、又は哺乳類細胞における発現のためにコドン最適化された、天然配列であった。

#### 【0483】

標的化配列を付加した対応する単一ガイドRNA配列(sgRNA)を、第2の哺乳類発現ベクターにクローニングした。2つのプラスミドをHEK293T細胞に共トランスフェクトした。発現プラスミドとsgRNA標的化プラスミドをHEK293T細胞に共トランスフェクションしてから72時間後、DNAを抽出し、NGSライブラリーの調製に使用した。NHEJの割合を標的部位のシーケンシングにおけるインデルを介して測定して、哺乳類細胞における酵素の標的化効率を示した。各タンパク質の活性を試験するために、約7~12個の異なる標的部位を選択した。5%インデルの任意の閾値を使用して、活性候補を特定した。

#### 【0484】

実施例7-B2MのDNAレベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット(Miltenyi)を使用して、PBMCから初代T細胞を精製した。MG3-6 RNP(106 pmolのタンパク質/160 pmolのガイド)(配列番号6305~6386)のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用してT細胞(200,000)に行った。トランスフェクションの5日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを作製し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した(配列番号6387~6468)。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専用のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した(図1)。

#### 【0485】

10

20

30

40

50

## 【表 1 - 1】

表 1 A : 実施例 7 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6305 | MG3-6-B2M-sgRNA-A1 | mC*mG*mC*rUrArCrUrCrUrCrUrUrCrUrGrGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 6306 | MG3-6-B2M-sgRNA-B1 | mA*mG*mA*rGrArCrUrCrArCrGrCrUrGrGrArUrArGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6307 | MG3-6-B2M-sgRNA-C1 | mG*mA*mG*rArGrArGrUrArGrCrGrCrGrArGrCrArCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6308 | MG3-6-B2M-sgRNA-D1 | mC*mC*mC*rGrArUrArUrUrCrCrUrCrArGrGrUrArCrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6309 | MG3-6-B2M-sgRNA-E1 | mA*mU*mU*rCrCrUrCrArGrGrUrArCrUrCrCrArArArGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6310 | MG3-6-B2M-sgRNA-F1 | mA*mA*mU*rUrUrCrCrUrGrArArUrUrGrCrUrArUrGrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

【 0 4 8 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                           |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6311 | MG3-6-B2M-sgRNA-G1 | mG*mA*mG*rArArUrUrGrArArArArGrUrGrGrArGrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6312 | MG3-6-B2M-sgRNA-H1 | mG*mC*mA*rUrUrCrArGrArCrUrUrGrUrCrUrUrUrCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6313 | MG3-6-B2M-sgRNA-A2 | mA*mG*mA*rCrUrUrArCrCrCrArCrUrUrArArCrUrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6314 | MG3-6-B2M-sgRNA-B2 | mU*mU*mC*rArGrUrGrUrArGrUrArCrArArGrArGrArUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6315 | MG3-6-B2M-sgRNA-C2 | mA*mG*mU*rUrCrUrCrCrUrUrGrGrUrGrGrCrCrCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6316 | MG3-6-B2M-sgRNA-D2 | mG*mU*mG*rGrCrCrCrGrCrCrGrUrGrGrGrCrUrArGrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6317 | MG3-6-B2M-sgRNA-E2 | mC*mC*mG*rCrCrGrUrGrGrGrCrUrArGrUrCrCrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6318 | MG3-6-B2M-sgRNA-F2 | mG*mC*mC*rCrCrUrUrUrCrGrGrCrGrGrGrArGrCrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6319 | MG3-6-B2M-sgRNA-G2 | mG*mA*mC*rCrUrUrUrGrGrCrCrUrArCrGrGrCrGrArCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6320 | MG3-6-B2M-sgRNA-H2 | mG*mC*mG*rUrCrGrArUrArArGrCrGrUrCrArGrArGrCrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

【 0 4 8 7 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|----------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                    | rUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                  |
| 632<br>1 | MG3-6-B2M-sgRNA-A3 | mC*mG*mU*rCrArGrArGrCrGrCrGrArGrGrUrUrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 632<br>2 | MG3-6-B2M-sgRNA-B3 | mG*mG*mG*rUrUrUrCrUrCrUrUrCrCrGrCrUrCrUrUrUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 632<br>3 | MG3-6-B2M-sgRNA-C3 | mG*mC*mG*rCrArGrCrUrGrGrArGrUrGrGrGrGrGrArCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 632<br>4 | MG3-6-B2M-sgRNA-D3 | mG*mC*mU*rCrGrUrCrCrCrArArArGrGrCrGrCrGrCrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 632<br>5 | MG3-6-B2M-sgRNA-E3 | mU*mG*mU*rGrArArCrGrCrGrUrGrGrArGrGrGrCrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 632<br>6 | MG3-6-B2M-sgRNA-F3 | mG*mU*mC*rUrGrCrUrGrCrGrCrUrCrUrGrCrUrUrCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 632<br>7 | MG3-6-B2M-sgRNA-G3 | mG*mC*mU*rUrCrCrCrUrUrArGrArCrUrGrGrArGrArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 632<br>8 | MG3-6-B2M-sgRNA-H3 | mA*mA*mG*rUrUrCrGrCrArUrGrUrCrCrUrArGrCrArCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 632<br>9 | MG3-6-B2M-sgRNA-A4 | mU*mC*mC*rUrArGrCrArCrCrUrCrUrGrGrGrUrCrUrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 633<br>0 | MG3-6-B2M-sgRNA-B4 | mC*mC*mU*rCrCrCrArCrGrGrUrGrUrGrGrCrCrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUr                                                                     |

【 0 4 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                    | rCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                        |
| 633<br>1 | MG3-6-B2M-sgRNA-C4 | mA*mA*mG*rGrGrArArGrCrArGrArGrCrCrGrCrArGrCrArGrGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA<br>rUrGrU*mU*mU*mU |
| 633<br>2 | MG3-6-B2M-sgRNA-D4 | mG*mC*mU*rUrArCrCrCrGrGrCrGrArCrGrCrCrUrCrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 633<br>3 | MG3-6-B2M-sgRNA-E4 | mC*mU*mC*rCrArGrCrUrGrCrGrCrUrGrGrGrGrArGrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 633<br>4 | MG3-6-B2M-sgRNA-F4 | mU*mU*mG*rUrCrCrCrGrArCrCrCrUrCrCrCrGrUrCrGrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU |
| 633<br>5 | MG3-6-B2M-sgRNA-G4 | mG*mA*mC*rCrCrUrCrCrCrGrUrCrGrCrCrGrUrArGrGrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU |
| 633<br>6 | MG3-6-B2M-sgRNA-H4 | mG*mU*mG*rCrGrCrArCrCrCrCrUrUrCrCrCrCrArCrUrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 633<br>7 | MG3-6-B2M-sgRNA-A5 | mC*mC*mA*rGrGrCrCrArCrCrCrCrGrCrCrGrCrUrUrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 633<br>8 | MG3-6-B2M-sgRNA-B5 | mG*mC*mC*rGrCrUrUrCrCrCrGrArGrArUrCrCrArGrCrCrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 633<br>9 | MG3-6-B2M-sgRNA-C5 | mC*mC*mA*rGrCrCrCrUrGrGrArCrUrArGrCrCrCrArCrGrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 634<br>0 | MG3-6-B2M-sgRNA-D5 | mU*mC*mA*rCrGrGrArGrCrGrArGrArGrArGrCrArCrArGrCrGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGr                                                                                                                                   |

10

20

30

40

【 0 4 8 9 】

【表 1 - 5】

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                           |
|----------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                    | CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                       |
| 634<br>1 | MG3-6-B2M-sgRNA-E5 | mA*mG*mA*rGrGrGrUrGrCrArGrArGrCrGrGrGrArGrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 634<br>2 | MG3-6-B2M-sgRNA-F5 | mA*mG*mG*rArCrCrArGrArGrCrGrGrGrArGrGrUrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 634<br>3 | MG3-6-B2M-sgRNA-G5 | mC*mG*mA*rGrArUrUrGrArArGrUrCrArArGrCrCrUrArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 634<br>4 | MG3-6-B2M-sgRNA-H5 | mA*mG*mA*rArArArArCrGrCrCrUrGrCrCrUrUrCrUrGrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 634<br>5 | MG3-6-B2M-sgRNA-A6 | mU*mC*mU*rCrCrArGrArGrCrArArArCrUrGrGrGrCrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 634<br>6 | MG3-6-B2M-sgRNA-B6 | mG*mG*mC*rCrCrUrGrUrGrGrUrCrUrUrUrCrGrUrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 634<br>7 | MG3-6-B2M-sgRNA-C6 | mA*mC*mU*rUrUrCrGrGrUrUrUrUrGrArArArArCrArUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 634<br>8 | MG3-6-B2M-sgRNA-D6 | mA*mA*mA*rGrArGrGrArArGrCrCrCrUrCrUrGrUrArCrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 634<br>9 | MG3-6-B2M-sgRNA-E6 | mA*mG*mC*rCrCrUrCrUrGrUrArCrGrArArArArGrArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 635      | MG3-6-B2M-sgRNA-F6 | mU*mG*mC*rGrCrUrCrCrGrCrArArArArGrCrCrCrUrGrGrGrUr                                                                                                                                                                           |

【 0 4 9 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0    |                    | UrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                         |
| 6351 | MG3-6-B2M-sgRNA-G6 | mA*mA*mA*rArGrArArArArGrArArArGrArArArGrArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6352 | MG3-6-B2M-sgRNA-H6 | mA*mA*mA*rGrArUrArArUrCrCrArArGrArUrGrGrUrUrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6353 | MG3-6-B2M-sgRNA-A7 | mU*mA*mC*rCrArArGrArCrUrGrUrUrGrArGrArCrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6354 | MG3-6-B2M-sgRNA-B7 | mU*mC*mC*rArArArGrUrArArUrArCrArUrGrCrArUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6355 | MG3-6-B2M-sgRNA-C7 | mA*mU*mU*rArCrUrUrUrGrGrArArArUrUrUrUrCrArArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6356 | MG3-6-B2M-sgRNA-D7 | mA*mA*mA*rUrArArGrArUrUrUrUrUrUrUrUrArArArUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6357 | MG3-6-B2M-sgRNA-E7 | mU*mG*mC*rCrArGrGrUrArCrUrUrArGrArArArGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6358 | MG3-6-B2M-sgRNA-F7 | mC*mU*mC*rArArCrArGrUrCrUrUrGrGrUrArArCrCrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6359 | MG3-6-B2M-sgRNA-G7 | mU*mG*mA*rUrArCrUrUrGrUrCrCrUrCrUrCrUrUrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |

10

20

30

40

【 0 4 9 1 】

【表 1 - 7】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 636<br>0         | MG3-6-B2M-sgRNA-H7 | mG*mC*mU*rUrUrArArUrGrUrUrArUrGrArArArArArArGr<br>UrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrG<br>rCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrG<br>rUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUr<br>ArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 636<br>1         | MG3-6-B2M-sgRNA-A8 | mU*mA*mU*rGrArArArArArArUrCrArGrGrUrCrUrUrCrArGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA<br>rUrGrU*mU*mU*mU   |
| 636<br>2         | MG3-6-B2M-sgRNA-B8 | mG*mA*mU*rUrCrCrCrArArUrCrCrArCrCrUrCrUrUrGrArGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 636<br>3         | MG3-6-B2M-sgRNA-C8 | mG*mG*mC*rArGrCrUrArCrUrCrCrUrCrUrUrGrUrCrUrGrGrUr<br>UrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrC<br>rArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU<br>rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrAr<br>UrGrU*mU*mU*mU   |
| 636<br>4         | MG3-6-B2M-sgRNA-D8 | mG*mC*mU*rGrUrGrGrGrGrArGrArArGrGrArGrGrUrArGr<br>UrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrG<br>rCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrG<br>rUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUr<br>ArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 636<br>5         | MG3-6-B2M-sgRNA-E8 | mU*mA*mG*rArArArCrArCrCrUrArUrCrArUrUrArArGrGrGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA<br>rUrGrU*mU*mU*mU   |
| 636<br>6         | MG3-6-B2M-sgRNA-F8 | mA*mG*mG*rCrUrArCrUrArGrCrCrCrArUrCrArArGrArGrUr<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA<br>rUrGrU*mU*mU*mU    |
| 636<br>7         | MG3-6-B2M-sgRNA-G8 | mG*mA*mG*rGrUrGrGrArUrUrGrGrGrGrArArUrCrUrArArUrGr<br>UrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrG<br>rCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrG<br>rUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUr<br>ArUrGrU*mU*mU*mU |
| 636<br>8         | MG3-6-B2M-sgRNA-H8 | mA*mU*mA*rArGrArArCrArUrArUrUrArArUrGrCrCrUrCrGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA<br>rUrGrU*mU*mU*mU   |
| 636<br>9         | MG3-6-B2M-sgRNA-A9 | mU*mA*mA*rArUrGrCrCrUrCrArGrGrGrArUrCrArGrArGrCrGrU<br>rUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGr<br>CrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr<br>UrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrA                    |

10

20

30

40

【 0 4 9 2 】

50

【表 1 - 8】

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                     | rUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                  |
| 6370 | MG3-6-B2M-sgRNA-B9  | mC*mU*mC*rUrCrUrGrUrUrUrGrArGrGrGrArArGrGrCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6371 | MG3-6-B2M-sgRNA-C9  | mC*mU*mA*rArGrArArGrArGrArCrArArGrUrArUrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6372 | MG3-6-B2M-sgRNA-D9  | mC*mA*mC*rCrUrArUrCrCrCrUrGrUrUrGrUrArUrUrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6373 | MG3-6-B2M-sgRNA-E9  | mA*mU*mU*rUrGrCrCrArGrCrUrCrUrUrGrUrArUrGrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6374 | MG3-6-B2M-sgRNA-F9  | mG*mA*mA*rArUrUrArGrGrUrArCrArArArGrUrCrArGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6375 | MG3-6-B2M-sgRNA-G9  | mU*mA*mU*rArArArArCrCrUrCrArGrCrArGrArArArUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6376 | MG3-6-B2M-sgRNA-H9  | mU*mG*mU*rUrGrUrUrUrGrGrUrArArGrArArCrArUrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6377 | MG3-6-B2M-sgRNA-A10 | mA*mA*mC*rArArArArCrCrUrCrUrUrUrArUrUrUrCrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6378 | MG3-6-B2M-sgRNA-B10 | mA*mU*mU*rUrCrUrGrCrUrGrArGrGrUrUrUrUrArUrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6379 | MG3-6-B2M-sgRNA-C10 | mG*mC*mA*rArArUrArCrCrUrUrArArArUrGrGrUrUrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGr                                                                   |

10

20

30

40

【 0 4 9 3 】

【表 1 - 9】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                    | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                         |                     | UrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                           |
| 6380                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-D10 | mA*mU*mA*rArArUrArCrArArCrArGrGrArUrArGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6381                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-E10 | mA*mA*mU*rGrGrArGrUrArArUrGrCrArUrGrUrGrArCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6382                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-F10 | mA*mC*mA*rGrGrUrGrArUrUrGrCrUrGrUrArArArCrUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6383                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-G10 | mC*mU*mU*rUrCrCrArArArUrGrArGrArGrCrArUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6384                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-H10 | mA*mA*mU*rArUrUrGrCrCrArGrGrGrUrArUrUrUrCrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6385                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-A11 | mU*mG*mC*rCrUrUrUrUrUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6386                                                                                                                                                                                                                                                                    | MG3-6-B2M-sgRNA-B11 | mU*mC*mU*rArGrCrArGrUrArUrCrUrUrCrUrGrUrCrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに 2' -O メチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに 2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |                     |                                                                                                                                                                                                                            |

【 0 4 9 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 2 - 1】

表 1 B : 実施例 7 で標的とした部位

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------|-------------------|-------------------------|
| 6387 | MG3-6-B2M-標的部位-A1 | CGCTACTCTCTCTTCTGGCCT   |
| 6388 | MG3-6-B2M-標的部位-B1 | AGAGACTCACGCTGGATAGCCT  |
| 6389 | MG3-6-B2M-標的部位-C1 | GAGAGAGTAGCGCGAGCACAGC  |
| 6390 | MG3-6-B2M-標的部位-D1 | CCCGATATTCCTCAGGTACTCC  |
| 6391 | MG3-6-B2M-標的部位-E1 | ATTCTCAGGTACTCCAAAGAT   |
| 6392 | MG3-6-B2M-標的部位-F1 | AATTCCTGAATTGCTATGTGT   |
| 6393 | MG3-6-B2M-標的部位-G1 | GAGAATTGAAAAAGTGGAGCAT  |
| 6394 | MG3-6-B2M-標的部位-H1 | GCATTCAGACTTGTCTTTCAGC  |
| 6395 | MG3-6-B2M-標的部位-A2 | AGACTTACCCCACTTAACTATC  |
| 6396 | MG3-6-B2M-標的部位-B2 | TTCAGTGTAGTACAAGAGATAG  |
| 6397 | MG3-6-B2M-標的部位-C2 | AGTTCTCCTTGGTGGCCCCGCCG |
| 6398 | MG3-6-B2M-標的部位-D2 | GTGGCCCCGCCGTGGGGCTAGTC |
| 6399 | MG3-6-B2M-標的部位-E2 | CCGCCGTGGGGCTAGTCCAGGG  |
| 6400 | MG3-6-B2M-標的部位-F2 | GCCCCTTTCGGCGGGGAGCAGG  |
| 6401 | MG3-6-B2M-標的部位-G2 | GACCTTTGGCCTACGGCGACGG  |
| 6402 | MG3-6-B2M-標的部位-H2 | GCGTCGATAAGCGTCAGAGCGC  |
| 6403 | MG3-6-B2M-標的部位-A3 | CGTCAGAGCGCCGAGGTTGGGG  |
| 6404 | MG3-6-B2M-標的部位-B3 | GGGTTTCTCTCCGCTCTTTTCG  |
| 6405 | MG3-6-B2M-標的部位-C3 | GCGCAGCTGGAGTGGGGGACGG  |
| 6406 | MG3-6-B2M-標的部位-D3 | GCTCGTCCCAAAGGCGCGGCGC  |
| 6407 | MG3-6-B2M-標的部位-E3 | TGTGAACGCGTGGAGGGGCGCT  |
| 6408 | MG3-6-B2M-標的部位-F3 | GTCTGCTGCGGCTCTGCTTCCC  |
| 6409 | MG3-6-B2M-標的部位-G3 | GCTTCCCTTAGACTGGAGAGCT  |
| 6410 | MG3-6-B2M-標的部位-H3 | AAGTTCGCATGTCCTAGCACCT  |

【 0 4 9 5 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

| 配列番号     | エンティティ名           | 配列                      |
|----------|-------------------|-------------------------|
| 641<br>1 | MG3-6-B2M-標的部位-A4 | TCCTAGCACCTCTGGGTCTATG  |
| 641<br>2 | MG3-6-B2M-標的部位-B4 | CCTCCCCACGGTGTGGCCCCAC  |
| 641<br>3 | MG3-6-B2M-標的部位-C4 | AAGGGAAGCAGAGCCGCAGCAG  |
| 641<br>4 | MG3-6-B2M-標的部位-D4 | GCTTACCCGGGCGACGCCTCCC  |
| 641<br>5 | MG3-6-B2M-標的部位-E4 | CTCCAGCTGCGCTGGGGGAGCC  |
| 641<br>6 | MG3-6-B2M-標的部位-F4 | TTGTCCCGACCCTCCCGTCGCC  |
| 641<br>7 | MG3-6-B2M-標的部位-G4 | GACCCTCCCGTCGCCGTAGGCC  |
| 641<br>8 | MG3-6-B2M-標的部位-H4 | GTGCGCACCCCCTTCCCCACTC  |
| 641<br>9 | MG3-6-B2M-標的部位-A5 | CCAGGCCACCCGCGCTTCCC    |
| 642<br>0 | MG3-6-B2M-標的部位-B5 | GCCGCTTCCCGAGATCCAGCC   |
| 642<br>1 | MG3-6-B2M-標的部位-C5 | CCAGCCCTGGACTAGCCCCACG  |
| 642<br>2 | MG3-6-B2M-標的部位-D5 | TCACGGAGCGAGAGACACAGC   |
| 642<br>3 | MG3-6-B2M-標的部位-E5 | AGAGGGTGCAGAGCGGGAGAGG  |
| 642<br>4 | MG3-6-B2M-標的部位-F5 | AGGACCAGAGCGGGAGGGTAGG  |
| 642<br>5 | MG3-6-B2M-標的部位-G5 | CGAGATTGAAGTCAAGCCTAAC  |
| 642<br>6 | MG3-6-B2M-標的部位-H5 | AGAAAAACGCCTGCCTTCTGCG  |
| 642<br>7 | MG3-6-B2M-標的部位-A6 | TCTCCAGAGCAAACCTGGGCGGC |
| 642<br>8 | MG3-6-B2M-標的部位-B6 | GGCCCTGTGGTCTTTTCGTACA  |
| 642<br>9 | MG3-6-B2M-標的部位-C6 | ACTTTCGGTTTTTGAAAACATGA |
| 643<br>0 | MG3-6-B2M-標的部位-D6 | AAAGAGGAAGCCCTCTGTACGA  |
| 643<br>1 | MG3-6-B2M-標的部位-E6 | AGCCCTCTGTACGAAAAGACCA  |
| 643<br>2 | MG3-6-B2M-標的部位-F6 | TGCGCTCCCGCAAAAGCCCTGG  |
| 643<br>3 | MG3-6-B2M-標的部位-G6 | AAAAGAAAAGAAAGAAAGAAGT  |
| 643<br>4 | MG3-6-B2M-標的部位-H6 | AAAGATAATCCAAGATGGTTAC  |

【 0 4 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------------------|-------------------|-------------------------|
| 643<br>5         | MG3-6-B2M-標的部位-A7 | TACCAAGACTGTTGAGGACGCC  |
| 643<br>6         | MG3-6-B2M-標的部位-B7 | TCCAAAGTAATACATGCCATGC  |
| 643<br>7         | MG3-6-B2M-標的部位-C7 | ATTACTTTGGAAATTTTCAAAA  |
| 643<br>8         | MG3-6-B2M-標的部位-D7 | AAATAAGATTTTTTTTAAATA   |
| 643<br>9         | MG3-6-B2M-標的部位-E7 | TGCCAGGTACTTAGAAAGTGCT  |
| 644<br>0         | MG3-6-B2M-標的部位-F7 | CTCAACAGTCTTGGAACCATC   |
| 644<br>1         | MG3-6-B2M-標的部位-G7 | TGATACTTGTCCTCTTCTAGA   |
| 644<br>2         | MG3-6-B2M-標的部位-H7 | GCTTTTAATGTTATGAAAAAAA  |
| 644<br>3         | MG3-6-B2M-標的部位-A8 | TATGAAAAAAATCAGGTCTTCA  |
| 644<br>4         | MG3-6-B2M-標的部位-B8 | GATTCCTCAATCCACCTCTGA   |
| 644<br>5         | MG3-6-B2M-標的部位-C8 | GGCAGCTACTCCTCCTTGTCTG  |
| 644<br>6         | MG3-6-B2M-標的部位-D8 | GCTGTGGGGAGAAGGAGGAGTA  |
| 644<br>7         | MG3-6-B2M-標的部位-E8 | TAGAAACACCCTATCATTAAAGG |
| 644<br>8         | MG3-6-B2M-標的部位-F8 | AGGCTACTAGCCCCATCAAGAG  |
| 644<br>9         | MG3-6-B2M-標的部位-G8 | GAGGTGGATTGGGGAATCTAAT  |
| 645<br>0         | MG3-6-B2M-標的部位-H8 | ATAAGAACATATTAAATGCCTC  |
| 645<br>1         | MG3-6-B2M-標的部位-A9 | TAAATGCCTCAGGGATCAGAGC  |
| 645<br>2         | MG3-6-B2M-標的部位-B9 | CTCTCTGTTTGAGGGAAGGCGG  |
| 645<br>3         | MG3-6-B2M-標的部位-C9 | CTAAGAAGAGGACAAGTATCAG  |
| 645<br>4         | MG3-6-B2M-標的部位-D9 | CACCTATCCCTGTTGTATTTA   |
| 645<br>5         | MG3-6-B2M-標的部位-E9 | ATTTGCCAGCTCTTGTATGCAT  |
| 645<br>6         | MG3-6-B2M-標的部位-F9 | GAAATTAGGTACAAAGTCAGAG  |
| 645<br>7         | MG3-6-B2M-標的部位-G9 | TATAAACCTCAGCAGAAATAA   |
| 645<br>8         | MG3-6-B2M-標的部位-H9 | TGTTGTTTGGTAAGAACATACC  |

【 0 4 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                     |
|------|--------------------|------------------------|
| 6459 | MG3-6-B2M-標的部位-A10 | AACAAAACCTCTTTATTTCTGC |
| 6460 | MG3-6-B2M-標的部位-B10 | ATTTCTGCTGAGGTTTTATATG |
| 6461 | MG3-6-B2M-標的部位-C10 | GCAAATACCTTAAATGGTTGAG |
| 6462 | MG3-6-B2M-標的部位-D10 | ATAAAATACAACAGGGATAGGT |
| 6463 | MG3-6-B2M-標的部位-E10 | AATGGAGTAATGCATGTGACAG |
| 6464 | MG3-6-B2M-標的部位-F10 | ACAGGTGATTGCTGTAAACTAG |
| 6465 | MG3-6-B2M-標的部位-G10 | CTTCCAAAATGAGAGGCATGA  |
| 6466 | MG3-6-B2M-標的部位-H10 | AATATTGCCAGGGTATTTCACT |
| 6467 | MG3-6-B2M-標的部位-A11 | TGCCTTTTTTGTTTTTTTCTA  |
| 6468 | MG3-6-B2M-標的部位-B11 | TCTAGCAGTATCTTCTGTCACT |

10

20

## 【0498】

## 実施例 8 - マウス TRAC の DNA レベルでの遺伝子編集結果

初代 T 細胞を、C57BL/6 マウス脾臓から精製した。MG3-6 RNP (126 pmol のタンパク質 / 160 pmol のガイド) (配列番号 6469 ~ 6508) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーター及び 100 pmol のトランスフェクションエンハンサー (IDT) を使用して T 細胞 (200,000) に行った。トランスフェクションの 5 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 6509 ~ 6548) 。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専有の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 2) 。フローサイトメトリーによる分析のため、ヌクレオフェクションの 3 日後、100,000 個のマウス T 細胞を抗マウス CD3 抗体 (クローン 17A2、Invitrogen 11-0032-82) で、4℃で 30 分間染色し、Attune NxT フローサイトメーターで分析した。

30

## 【0499】

40

50

## 【表 3 - 1】

表 2 A : 実施例 8 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名              | 配列                                                                                                                                                                                                                            |
|------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6469 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-A1 | mA*mG*mA*rArCrCrUrGrCrUrGrUrArCrCrArGrUrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 6470 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-B1 | mA*mA*mC*rUrGrUrGrCrUrGrGrArCrArUrGrArArArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6471 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-C1 | mA*mA*mG*rCrUrArUrGrGrArUrUrCrCrArArGrArGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6472 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-D1 | mU*mC*mA*rCrCrUrGrCrCrArArGrArUrArUrCrUrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6473 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-E1 | mA*mG*mU*rUrUrUrGrUrCrArGrUrGrArUrGrArArCrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6474 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-F1 | mG*mA*mA*rCrArGrGrCrArGrArGrGrUrGrCrUrGrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6475 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-G1 | mC*mA*mG*rArGrGrGrUrGrCrUrGrUrCrCrUrGrArGrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6476 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-H1 | mA*mG*mG*rArUrCrUrUrUrArArCrUrGrGrUrArCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6477 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-A2 | mU*mU*mU*rArArCrUrGrGrUrArCrArCrArGrCrArGrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6478 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-B2 | mA*mG*mG*rUrUrCrUrGrGrGrUrUrCrUrGrGrArUrGrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU    |

【 0 5 0 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

| 配列番号 | エンティティ名              | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                      | U*mU*mU                                                                                                                                                                                                                          |
| 6479 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-C2 | mA*mA*mC*rUrUrUrCrArArArCrCrUrGrUrCrArGrUrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6480 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-D2 | mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrGrCrUrGrArArArGrUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6481 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-E2 | mG*mG*mA*rUrUrUrArArCrCrUrGrCrUrCrArUrGrArCrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6482 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-F2 | mC*mU*mU*rUrCrArUrGrCrCrUrUrCrUrUrArCrCrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6483 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-G2 | mG*mA*mC*rCrArCrArGrCrCrUrCrArGrCrGrUrCrArUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6484 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-H2 | mU*mA*mA*rArUrCrCrGrGrCrUrArCrUrUrUrCrArGrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6485 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-A3 | mA*mG*mG*rArUrUrCrGrGrArGrUrCrCrCrArUrArArCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6486 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-B3 | mA*mU*mA*rArCrUrGrArCrArGrGrUrUrUrGrArArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6487 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-C3 | mG*mU*mA*rCrUrUrCrCrUrCrArCrUrCrCrArGrGrUrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6488 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-D3 | mC*mC*mA*rCrCrUrCrGrUrCrArArGrArCrGrGrCrUrGrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr                                                           |

10

20

30

40

【 0 5 0 1 】

【表 3 - 3】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                  | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                          | UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU                                                                                                                                                                                   |
| 648<br>9         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>E3 | mU*mG*mG*rCrCrUrGrArUrUrCrArArArUrCrCrArArCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU     |
| 649<br>0         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>F3 | mU*mU*mC*rArCrArArUrCrCrArCrCrUrGrGrArUrCrUrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>1         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>G3 | mC*mU*mG*rGrArUrCrUrCrCrArGrArUrUrUrGrUrGrArGrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>2         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>H3 | mC*mA*mU*rUrCrArCrArArArArArArCrGrGrCrArGrGrGrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>3         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>A4 | mA*mA*mC*rGrGrCrArGrGrGrGrCrGrGrGrCrUrUrCrUrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>4         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>B4 | mG*mG*mG*rCrGrGrGrGrCrUrUrCrUrCrUrGrGrArUrCrUrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>5         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>C4 | mA*mU*mC*rUrGrArArGrArCrCrCrCrUrCrCrCrCrArUrGrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 649<br>6         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>D4 | mG*mU*mU*rUrUrUrGrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 649<br>7         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>E4 | mG*mG*mU*rGrUrArGrArArArUrUrArUrCrUrCrArUrUrGrUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 649<br>8         | MG3-6-mTRAC-sgRNA-<br>F4 | mG*mG*mC*rUrCrArArUrArCrArCrArCrArGrUrArGrCrArGrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU                                                                                                                                |

【 0 5 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

| 配列番号 | エンティティ名              | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                      | rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                  |
| 6499 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-G4 | mA*mU*mU*rUrUrUrUrUrArCrArArCrArUrUrCrUrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU               |
| 6500 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-H4 | mA*mC*mA*rGrGrGrGrArGrUrCrUrGrCrArUrGrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                 |
| 6501 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-A5 | mG*mU*mC*rUrGrCrCrArUrGrGrGrGrGrArGrGrGrGrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6502 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-B5 | mA*mG*mC*rArArCrCrUrUrCrCrUrCrArCrArArArUrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU           |
| 6503 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-C5 | mU*mC*mA*rCrArArArUrCrUrGrGrGrArGrArUrCrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU             |
| 6504 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-D5 | mA*mG*mA*rUrCrCrArGrGrUrGrGrGrArUrUrGrUrGrArArUrGrUrUrGrArGrArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6505 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-E5 | mU*mG*mG*rGrArUrUrGrUrGrArArUrCrArGrGrGrCrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6506 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-F5 | mG*mA*mC*rArGrCrCrGrUrCrUrUrGrArCrGrArGrGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU           |
| 6507 | MG3-6-mTRAC-sgRNA-G5 | mU*mG*mA*rGrGrArGrGrArUrGrGrArGrCrUrUrGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 650  | MG3-6-mTRAC-sgRNA-   | mG*mG*mA*rGrUrCrArGrGrCrUrCrUrGrUrCrArGrUrCrUrUrGrUrUr                                                                                                                                                                           |

10

20

30

40

【 0 5 0 3 】

【表 3 - 5】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                 | エンティティ名 | 配列                                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8                                                                                                                                                                                                                                                                    | H5      | GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |         |                                                                                                                                                                              |

10

【0504】

【表 4 - 1】

表 2 B : 実施例 8 で標的とした部位のリスト

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                     |
|------|---------------------|------------------------|
| 6509 | MG3-6-mTRAC-標的部位-A1 | AGAACCTGCTGTGTACCAGTTA |
| 6510 | MG3-6-mTRAC-標的部位-B1 | AACTGTGCTGGACATGAAAGCT |
| 6511 | MG3-6-mTRAC-標的部位-C1 | AAGCTATGGATTCCAAGAGCAA |
| 6512 | MG3-6-mTRAC-標的部位-D1 | TCACCTGCCAAGATATCTTCAA |
| 6513 | MG3-6-mTRAC-標的部位-E1 | AGTTTTGTCAGTGATGAACGTT |
| 6514 | MG3-6-mTRAC-標的部位-F1 | GAACAGGCAGAGGGTGCTGTCC |
| 6515 | MG3-6-mTRAC-標的部位-G1 | CAGAGGGTGCTGTCTGAGACC  |
| 6516 | MG3-6-mTRAC-標的部位-H1 | AGGATCTTTTAACTGGTACACA |
| 6517 | MG3-6-mTRAC-標的部位-A2 | TTTAACTGGTACACAGCAGGTT |
| 6518 | MG3-6-mTRAC-標的部位-B2 | AGGTTCTGGGTTCTGGATGTCT |
| 6519 | MG3-6-mTRAC-標的部位-C2 | AACTTTCAAAACCTGTCAGTTA |
| 6520 | MG3-6-mTRAC-標的部位-D2 | CGAATCCTCTGCTGAAAGTAG  |
| 6521 | MG3-6-mTRAC-標的部位-E2 | GGATTTAACCTGCTCATGACGC |
| 6522 | MG3-6-mTRAC-標的部位-F2 | CTTTCATGCCTTCTTACCTCAA |

20

30

40

【0505】

50

【表 4 - 2】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                 | 配列                      |
|------------------|-------------------------|-------------------------|
| 652<br>3         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>G2 | GACCACAGCCTCAGCGTCATGA  |
| 652<br>4         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>H2 | TAAATCCGGCTACTTTCAGCAG  |
| 652<br>5         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>A3 | AGGATTCCGGAGTCCCATAACTG |
| 652<br>6         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>B3 | ATAACTGACAGGTTTTGAAAGT  |
| 652<br>7         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>C3 | GTACTTCCTCACTCCAGGTCTG  |
| 652<br>8         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>D3 | CCACCTCGTCAAGACGGCTGTC  |
| 652<br>9         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>E3 | TGGCCCTGATTCACAATCCCAC  |
| 653<br>0         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>F3 | TTCACAATCCCACCTGGATCTC  |
| 653<br>1         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>G3 | CTGGATCTCCCAGATTGTGAG   |
| 653<br>2         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>H3 | CATTCAAAAAACGGCAGGGG    |
| 653<br>3         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>A4 | AACGGCAGGGGCGGGGCTTCTC  |
| 653<br>4         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>B4 | GGGCGGGGCTTCTCCTGGATCT  |
| 653<br>5         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>C4 | ATCTGAAGACCCCTCCCCATG   |
| 653<br>6         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>D4 | GTTTTTTGTTTTTTTTTTTTT   |
| 653<br>7         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>E4 | GGTGTAGAAATTATCTCATTGT  |
| 653<br>8         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>F4 | GGCTCAATACACACAGTAGCAG  |
| 653<br>9         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>G4 | ATTTTTTTTACAACATTCTCCA  |
| 654<br>0         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>H4 | ACAGGGGAGTCTGCCATGGGGG  |
| 654<br>1         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>A5 | GTCTGCCATGGGGGAGGGGTCT  |
| 654<br>2         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>B5 | AGCAACCTTCCTCACAAATCTG  |
| 654<br>3         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>C5 | TCACAAATCTGGGAGATCCAGG  |
| 654<br>4         | MG3-6-mTRAC-標的部位-<br>D5 | AGATCCAGGTGGGATTGTGAAT  |
| 654<br>5         | MG3-6-mTRAC-標的部位-       | TGGGATTGTGAATCAGGGCCAA  |

【 0 5 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 4－3】

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                     |
|------|---------------------|------------------------|
|      | E5                  |                        |
| 6546 | MG3-6-mTRAC-標的部位-F5 | GACAGCCGTCTTGACGAGGTGG |
| 6547 | MG3-6-mTRAC-標的部位-G5 | TGAGGAGGATGGAGCTTGGGAG |
| 6548 | MG3-6-mTRAC-標的部位-H5 | GGAGTCAGGCTCTGTCAGTCTT |

10

## 【0507】

## 実施例 9－HPRT の DNA レベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット（Miltenyi）を使用して、PBMC から初代 T 細胞を精製した。MG3-6 RNP（126 pmol のタンパク質／160 pmol のガイド）（配列番号 6549～6615）のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して T 細胞（200,000）に行った。トランスフェクションの 5 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した（配列番号 6616～6682）。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図 3）。

20

## 【0508】

## 【表 5－1】

表 3 A：実施例 9 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6549 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A1 | mU*mU*mC*rCrUrCrUrGrCrArUrCrArGrUrUrUrArArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6550 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B1 | mG*mU*mG*rGrGrCrUrUrGrUrGrUrUrCrUrArArArGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6551 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C1 | mA*mG*mG*rArGrUrGrArGrArUrUrGrGrUrUrUrUrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

30

40

## 【0509】

50

【表 5 - 2】

| 配列番号     | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|----------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                     | U*mU*mU                                                                                                                                                                                                                          |
| 655<br>2 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D1 | mU*mA*mA*rArArArArUrArArUrUrUrArArUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU           |
| 655<br>3 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E1 | mG*mA*mG*rUrArUrUrUrUrArUrUrGrArArArArGrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 655<br>4 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F1 | mA*mA*mA*rArArUrArUrUrUrUrCrCrCrUrArArCrArArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 655<br>5 | MG3-6-HPRT-sgRNA-G1 | mA*mU*mC*rUrCrArGrCrUrArUrUrUrArGrUrCrArArArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 655<br>6 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H1 | mG*mU*mC*rCrUrArCrUrUrUrUrGrArCrUrArArArUrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 655<br>7 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A2 | mA*mA*mC*rUrCrUrCrCrArArUrArUrArGrGrUrGrGrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 655<br>8 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B2 | mA*mU*mU*rUrUrUrCrCrArArUrArArArUrUrCrArArGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 655<br>9 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C2 | mC*mC*mA*rGrGrArCrUrGrGrArUrUrUrUrGrUrArGrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 656<br>0 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D2 | mU*mG*mC*rArCrCrUrArCrArArArArUrCrCrArGrUrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 656<br>1 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E2 | mG*mU*mA*rArGrArArUrGrCrCrArGrCrCrCrCrArGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr                                                             |

【 0 5 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |                     | UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU                                                                                                                                                                                     |
| 656<br>2         | MG3-6-HPRT-sgRNA-F2 | mA*mA*mG*rCrArGrUrArArGrArArUrGrCrCrArGrCrCrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 656<br>3         | MG3-6-HPRT-sgRNA-G2 | mG*mC*mU*rGrGrCrArUrUrCrUrUrArCrUrGrCrUrUrGrCrUrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 656<br>4         | MG3-6-HPRT-sgRNA-H2 | mU*mG*mC*rUrUrGrCrUrGrArGrGrCrCrArGrArUrGrArUrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 656<br>5         | MG3-6-HPRT-sgRNA-A3 | mA*mU*mA*rGrArUrUrCrCrArGrArArUrArUrCrUrCrArUrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 656<br>6         | MG3-6-HPRT-sgRNA-B3 | mU*mG*mA*rCrArGrUrArUrUrGrCrArGrUrUrArUrArCrArUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 656<br>7         | MG3-6-HPRT-sgRNA-C3 | mC*mG*mA*rArArArGrUrArArUrGrUrArArUrCrUrCrArUrArGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 656<br>8         | MG3-6-HPRT-sgRNA-D3 | mG*mG*mA*rUrUrArUrArUrCrUrUrArArGrUrCrUrUrArUrArGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 656<br>9         | MG3-6-HPRT-sgRNA-E3 | mA*mA*mC*rArCrArUrGrArCrArArArUrUrArUrUrArArGrUrUr<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU    |
| 657<br>0         | MG3-6-HPRT-sgRNA-F3 | mG*mU*mU*rUrGrUrCrCrUrGrArArUrArGrCrArUrGrGrCrArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrCrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 657<br>1         | MG3-6-HPRT-sgRNA-G3 | mC*mU*mG*rArArUrArGrCrArUrGrGrCrArGrArGrArUrUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr                                                                                                                                     |

10

20

30

40

【 0 5 1 1 】

50

【表 5 - 4】

| 配列番号     | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                            |
|----------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                     | UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU                                                                                                               |
| 657<br>2 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H3 | mA*mU*mC*rCrUrUrArUrUrCrUrUrArArUrUrUrGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 657<br>3 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A4 | mG*mC*mC*rCrCrCrUrUrGrCrArArArArUrUrArArGrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 657<br>4 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B4 | mG*mG*mU*rGrArGrGrArArGrUrGrArUrArGrGrArArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 657<br>5 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C4 | mG*mU*mG*rArUrArGrGrArArGrGrGrUrGrGrGrCrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 657<br>6 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D4 | mG*mG*mA*rArGrGrGrUrGrGrGrCrCrCrUrGrArArGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 657<br>7 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E4 | mA*mA*mU*rUrCrCrArGrGrArGrGrUrCrCrArGrArUrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 657<br>8 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F4 | mU*mC*mA*rUrCrArCrUrCrArArUrUrCrCrArGrGrArGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 657<br>9 | MG3-6-HPRT-sgRNA-G4 | mC*mA*mG*rCrArUrUrCrArUrCrArCrUrCrArArUrUrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>0 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H4 | mC*mA*mG*rCrArUrArGrGrUrArArGrGrUrGrArGrGrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658      | MG3-6-HPRT-sgRNA-A5 | mA*mC*mA*rUrArArArArArCrUrGrCrArGrArCrUrGrArUrCrGrUrUr                                                                                                                                                                        |

【 0 5 1 2 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

| 配列番号     | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        |                     | GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU                                                       |
| 658<br>2 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B5 | mA*mC*mC*rUrGrArCrCrCrUrArCrArUrArArArArArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 658<br>3 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C5 | mG*mA*mU*rCrArGrUrCrUrGrCrArGrUrUrUrUrUrArUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>4 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D5 | mU*mC*mU*rGrCrUrUrUrUrUrCrCrUrArArGrUrGrArUrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>5 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E5 | mA*mC*mA*rGrArUrArCrCrGrUrGrArUrUrUrUrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 658<br>6 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F5 | mA*mC*mU*rGrCrUrGrArCrArUrArUrGrArCrUrCrArCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>7 | MG3-6-HPRT-sgRNA-G5 | mC*mA*mU*rArUrGrUrCrArGrCrArGrUrUrUrGrArCrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>8 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H5 | mU*mA*mU*rCrArGrUrGrArGrUrUrUrUrUrCrUrUrUrUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 658<br>9 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A6 | mG*mC*mU*rUrArUrUrUrUrUrCrUrArCrArUrGrCrUrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 659<br>0 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B6 | mU*mU*mA*rArArUrGrUrCrArArCrCrUrArCrUrGrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU   |

10

20

30

40

【 0 5 1 3 】

【表 5 - 6】

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6591 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C6 | mG*mA*mG*rGrArUrUrArArGrUrCrUrArUrGrCrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6592 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D6 | mA*mA*mG*rArArCrArArCrArArArGrArArUrArCrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6593 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E6 | mU*mG*mG*rUrArUrArUrGrCrUrGrUrGrGrArArUrUrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6594 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F6 | mG*mA*mG*rArUrArGrArCrUrGrGrUrUrCrGrUrGrArGrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU         |
| 6595 | MG3-6-HPRT-sgRNA-G6 | mG*mU*mA*rGrGrArCrArUrGrCrUrCrArArArCrArArUrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6596 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H6 | mA*mU*mU*rArArGrCrArGrCrUrGrCrUrCrArCrUrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6597 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A7 | mG*mA*mG*rArUrGrGrArGrCrUrUrUrArUrUrArArArCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6598 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B7 | mG*mA*mA*rCrUrCrArGrCrArCrUrUrCrArUrArUrGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6599 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C7 | mU*mG*mA*rGrUrUrCrUrCrUrUrGrArArCrUrCrUrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6600 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D7 | mA*mU*mU*rCrCrUrGrArGrUrUrCrArGrGrUrArGrGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU       |

10

20

30

40

【 0 5 1 4 】

【表 5 - 7】

| 配列番号 | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                     | U*mU*mU                                                                                                                                                                                                                        |
| 6601 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E7 | mU*mA*mU*rArUrArUrGrUrUrUrArArArGrArGrCrUrGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6602 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F7 | mG*mG*mU*rArUrGrArArArGrCrArUrArArGrUrUrUrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6603 | MG3-6-HPRT-sgRNA-G7 | mU*mG*mA*rGrArCrUrGrCrCrUrUrUrArArCrArUrCrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6604 | MG3-6-HPRT-sgRNA-H7 | mA*mA*mU*rArUrUrUrUrCrArArCrArGrGrCrArGrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6605 | MG3-6-HPRT-sgRNA-A8 | mC*mU*mC*rCrCrArCrArCrCrUrUrUrArUrArGrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6606 | MG3-6-HPRT-sgRNA-B8 | mU*mA*mU*rArGrUrUrUrArGrGrGrArUrUrGrUrArUrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6607 | MG3-6-HPRT-sgRNA-C8 | mA*mG*mG*rGrArUrUrGrUrArUrUrUrCrCrArArGrGrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6608 | MG3-6-HPRT-sgRNA-D8 | mA*mG*mU*rGrUrCrArArUrGrArGrCrArArArGrArUrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6609 | MG3-6-HPRT-sgRNA-E8 | mC*mC*mA*rUrUrGrArArGrGrGrArGrCrUrArArUrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6610 | MG3-6-HPRT-sgRNA-F8 | mU*mG*mG*rArCrArCrArUrGrGrGrUrArGrUrCrArGrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr                                                           |

【 0 5 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                  | エンティティ名             | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                     | GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                     |
| 661<br>1                                                                                                                                                                                                                                                              | MG3-6-HPRT-sgRNA-G8 | mC*mC*mU*rGrGrArArCrCrUrGrArArGrGrArCrArGrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 661<br>2                                                                                                                                                                                                                                                              | MG3-6-HPRT-sgRNA-H8 | mG*mU*mG*rCrArGrGrUrCrUrCrArGrArArCrUrGrUrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 661<br>3                                                                                                                                                                                                                                                              | MG3-6-HPRT-sgRNA-A9 | mA*mU*mG*rArArArUrGrGrArGrArGrCrUrArArArUrUrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 661<br>4                                                                                                                                                                                                                                                              | MG3-6-HPRT-sgRNA-B9 | mG*mU*mC*rArCrUrUrUrUrArArCrArCrArCrCrArArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 661<br>5                                                                                                                                                                                                                                                              | MG3-6-HPRT-sgRNA-C9 | mU*mA*mG*rArGrArGrGrCrArCrArUrUrUrGrCrCrArGrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば,mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -O メチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば,fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |                     |                                                                                                                                                                                                                                  |

【 0 5 1 6 】

【表 6 - 1】

表 3 B : 実施例 9 で標的とした部位

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                     |
|----------|--------------------|------------------------|
| 661<br>6 | MG3-6-HPRT-標的部位-A1 | TTCCTCTGCATCAGTTTAAATG |
| 661<br>7 | MG3-6-HPRT-標的部位-B1 | GTGGGCTTGTTCTAAAGGAG   |
| 661<br>8 | MG3-6-HPRT-標的部位-C1 | AGGAGTGAGATTGGTTTTTGT  |
| 661      | MG3-6-HPRT-標的部位-   | TAAAAAATAATATTTATAATTT |

【 0 5 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                | 配列                      |
|------------------|------------------------|-------------------------|
| 9                | D1                     |                         |
| 662<br>0         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E1 | GAGTATTTTATTGAAAAGCAT   |
| 662<br>1         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F1 | AAAAATATTTCCCTAACAAAG   |
| 662<br>2         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G1 | ATCTCAGCTATTTAGTCAAAAG  |
| 662<br>3         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H1 | GTCCTACTTTTGGACTAAATAGC |
| 662<br>4         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>A2 | AACTCTCCAATATAGGTGGCTA  |
| 662<br>5         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>B2 | ATTTTCCCATAAATTCAAGAT   |
| 662<br>6         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>C2 | CCAGGACTGGATTTTGTAGGTG  |
| 662<br>7         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>D2 | TGCACCTACAAAATCCAGTCCT  |
| 662<br>8         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E2 | GTAAGAATGCCAGCCCCAGGA   |
| 662<br>9         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F2 | AAGCAGTAAGAATGCCAGCCCC  |
| 663<br>0         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G2 | GCTGGCATTCCTTACTGCTTGCT |
| 663<br>1         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H2 | TGCTTGCTGAGGGCCAGATGAT  |
| 663<br>2         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>A3 | ATAGATTCCAGAATATCTCCAT  |
| 663<br>3         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>B3 | TGACAGTATTGCAGTTATACAT  |
| 663<br>4         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>C3 | CGAAAAGTAATGTAATCTCATA  |
| 663<br>5         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>D3 | GGATTATATCTTAAGTCTTATA  |
| 663<br>6         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E3 | AACACATGACAAAATTATTTAA  |
| 663<br>7         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F3 | GTTTGTCTGAATAGCATGGCA   |
| 663<br>8         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G3 | CTGAATAGCATGGCAGAGGATT  |
| 663<br>9         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H3 | ATCCTTATTCTTAATTTTGCAA  |
| 664<br>0         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>A4 | GCCCCCTTGCAAAATTAAGAAT  |
| 664<br>1         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>B4 | GGTGAGGAAGTGATAGGAAGGG  |

【 0 5 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                | 配列                     |
|------------------|------------------------|------------------------|
| 664<br>2         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>C4 | GTGATAGGAAGGGGTGGGCCCT |
| 664<br>3         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>D4 | GGAAGGGGTGGGCCCTGAAGAT |
| 664<br>4         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E4 | AATCCAGGAGGTCCAGATCTT  |
| 664<br>5         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F4 | TCATCACTCAATTCCAGGAGGT |
| 664<br>6         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G4 | CAGCATTCATCACTCAATTCCA |
| 664<br>7         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H4 | CAGCATAGGTAAGGTGAGGAGG |
| 664<br>8         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>A5 | ACATAAAAACTGCAGACTGATC |
| 664<br>9         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>B5 | ACCTGACCCCTACATAAAAACT |
| 665<br>0         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>C5 | GATCAGTCTGCAGTTTTTATGT |
| 665<br>1         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>D5 | TCTGCTTTTTCTTAAGTGATTA |
| 665<br>2         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E5 | ACAGATACCGTGATTTTTTCAA |
| 665<br>3         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F5 | ACTGCTGACATATGACTCACTA |
| 665<br>4         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G5 | CATATGTCAGCAGTTTGACTGT |
| 665<br>5         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H5 | TATCAGTGAGTTTTTCTTTTAA |
| 665<br>6         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>A6 | GCTTATTTTTCTACATGCTCTT |
| 665<br>7         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>B6 | TTAAATGTCAACCTACTGTGGC |
| 665<br>8         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>C6 | GAGGATTAAAGTCTATGCCACA |
| 665<br>9         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>D6 | AAGAACAACAAAAGAATACCCA |
| 666<br>0         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>E6 | TGGTATATGCTGTGGAATTGAG |
| 666<br>1         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>F6 | GAGATAGACTGGTTCGTGAGCG |
| 666<br>2         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>G6 | GTAGGACATGCTCAAACAATAC |
| 666<br>3         | MG3-6-HPRT-標的部位-<br>H6 | ATTAAGCAGCTGCTCACTACAA |
| 666<br>4         | MG3-6-HPRT-標的部位-       | GAGATGGAGCTTTATTAAACAT |

【 0 5 1 9 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                     |
|------|--------------------|------------------------|
|      | A7                 |                        |
| 6665 | MG3-6-HPRT-標的部位-B7 | GAACTCAGCACTTCATATGCCT |
| 6666 | MG3-6-HPRT-標的部位-C7 | TGAGTTCTCTTGAACCTCTAAT |
| 6667 | MG3-6-HPRT-標的部位-D7 | ATTCCTGAGTTCAGGTAGGGAG |
| 6668 | MG3-6-HPRT-標的部位-E7 | TATATATGTTTAAAGAGCTGGA |
| 6669 | MG3-6-HPRT-標的部位-F7 | GGTATGAAAGCATAAGTTTCT  |
| 6670 | MG3-6-HPRT-標的部位-G7 | TGAGACTGCCTTTAACATCTGT |
| 6671 | MG3-6-HPRT-標的部位-H7 | AATATTTTCAACAGGCAGCAT  |
| 6672 | MG3-6-HPRT-標的部位-A8 | CTCCCACACCCTTTTATAGTTT |
| 6673 | MG3-6-HPRT-標的部位-B8 | TATAGTTTAGGGATTGTATTTC |
| 6674 | MG3-6-HPRT-標的部位-C8 | AGGGATTGTATTTCGAAGGTTT |
| 6675 | MG3-6-HPRT-標的部位-D8 | AGTGTCAATGAGCAAAGATGAA |
| 6676 | MG3-6-HPRT-標的部位-E8 | CCATTGAAGGGGAGCTAATAAG |
| 6677 | MG3-6-HPRT-標的部位-F8 | TGGACACATGGGTAGTCAGGGT |
| 6678 | MG3-6-HPRT-標的部位-G8 | CCTGGAACCTGAAGGACAGTTC |
| 6679 | MG3-6-HPRT-標的部位-H8 | GTGCAGGTCTCAGAACTGTCCT |
| 6680 | MG3-6-HPRT-標的部位-A9 | ATGAAATGGAGAGCTAAATTAT |
| 6681 | MG3-6-HPRT-標的部位-B9 | GTCACCTTTAACACACCCAAGG |
| 6682 | MG3-6-HPRT-標的部位-C9 | TAGAGAGGCACATTTGCCAGTA |

## 【0520】

実施例10－ヒトTRBC1／2のDNAレベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット（Miltenyi）を使用して、PBMCから初代T細胞を精製した。MG3－6又はMG3－8 RNP（106 pmolのタンパク質／160 pmolのガイド）（MG3－6：配列番号6683～6721、MG3－8：配列番号6761～6781）のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用してT細胞（200,000）に行った。フローサイトメトリーによる分析のため、ヌクレオフェクションの3日後、100,000個のT細胞を抗CD3抗体で4℃で30分間染色し、Attune NxTフローサイトメーターで分析した（図4）。

## 【0521】

## 【表 7 - 1】

表 4 A : 実施例 10 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名                | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6683 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-A6 | mA*mG*mG*rUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6684 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-B6 | mC*mA*mG*rGrUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6685 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-C6 | mC*mC*mA*rCrArCrUrGrGrUrGrUrGrCrCrUrGrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6686 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-D6 | mG*mA*mA*rUrGrGrGrArArGrGrArGrGrUrGrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6687 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-E6 | mU*mG*mA*rGrGrGrCrGrGrCrUrGrCrUrCrCrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6688 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-F6 | mA*mG*mU*rArUrCrUrGrGrArGrUrCrArUrUrGrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6689 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-G6 | mA*mU*mA*rCrUrGrCrCrUrGrArGrCrArGrCrCrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6690 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-H6 | mU*mU*mG*rArCrArGrCrGrGrArArGrUrGrGrUrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr                                                                                                                 |

【 0 5 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

| 配列番号     | エンティティ名                | 配列                                                                                                                                                                                                                         |
|----------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                        | rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                            |
| 669<br>1 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-A7 | mC*mU*mU*rGrArCrArGrCrGrGrArArGrUrGrGrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>2 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-B7 | mC*mC*mG*rCrUrGrUrCrArArGrUrCrCrArGrUrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 669<br>3 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-C7 | mU*mC*mG*rGrArGrArArUrGrArCrGrArGrUrGrGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>4 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-D7 | mC*mA*mG*rArUrCrGrUrCrArGrCrGrCrCrGrArGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>5 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-E7 | mC*mG*mG*rCrGrCrUrGrArCrGrArUrCrUrGrGrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>6 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-F7 | mG*mC*mC*rArArCrArGrUrGrUrCrCrUrArCrCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>7 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-G7 | mC*mU*mU*rCrCrCrUrArGrCrArGrGrArUrCrUrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>8 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-H7 | mA*mU*mA*rCrArGrGrGrUrGrGrCrCrUrUrCrCrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 669<br>9 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-A8 | mG*mG*mC*rGrCrUrGrArCrCrArGrCrArCrArGrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 670      | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-   | mU*mC*mU*rCrUrUrCrUrGrCrArGrGrUrCrArArGrArGrGrUrUrGrAr                                                                                                                                                                     |

10

20

30

40

【 0 5 2 3 】

【表 7 - 3】

| 配列番号 | エンティティ名                | 配列                                                                                                                                                                                                                           |
|------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0    | B8                     | GrArArUrCrGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                   |
| 6701 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-C8 | mC*mC*mU*rGrCrArGrArArGrArGrArArArGrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6702 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-D8 | mA*mC*mC*rUrGrCrArGrArArGrArGrArArArGrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6703 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-E8 | mC*mC*mA*rCrArCrUrGrGrUrGrUrGrCrCrUrGrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6704 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-F8 | mA*mC*mC*rArGrCrUrCrArGrCrUrCrCrArCrGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6705 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-G8 | mG*mA*mA*rUrGrGrGrArArGrGrArGrGrUrGrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6706 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-H8 | mU*mG*mA*rGrGrCrGrGrCrUrGrCrUrCrCrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6707 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-A9 | mA*mG*mU*rArUrCrUrGrGrArGrUrCrArUrUrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6708 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-B9 | mA*mU*mA*rCrUrGrCrCrUrGrArGrCrArGrCrCrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6709 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-C9 | mU*mU*mG*rArCrArGrCrGrGrArArGrUrGrGrUrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

20

30

40

【0524】

【表 7 - 4】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 671<br>0         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>D9  | mC*mU*mU*rGrArCrArGrCrGrArArGrUrGrGrUrUrGrGrUrUrGrA<br>rGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC<br>rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU   |
| 671<br>1         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>E9  | mC*mC*mG*rCrUrGrUrCrArArGrUrCrCrArGrUrUrCrUrGrUrUrGrAr<br>GrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr<br>UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>2         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>F9  | mU*mC*mG*rGrArGrArArUrGrArCrGrArGrUrGrGrArCrGrUrUrGrA<br>rGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC<br>rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>3         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>G9  | mC*mA*mG*rArUrCrGrUrCrArGrCrGrCrGrArGrGrCrGrUrUrGrAr<br>GrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr<br>UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU   |
| 671<br>4         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>H9  | mC*mG*mG*rCrGrCrUrGrArCrGrArUrCrUrGrGrGrUrGrGrUrUrGrAr<br>GrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr<br>UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>5         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>A10 | mG*mU*mC*rArArCrArGrArGrUrCrUrUrArCrCrArGrCrGrUrUrGrAr<br>GrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr<br>UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>6         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>B10 | mC*mU*mU*rCrCrCrUrArGrCrArArGrArUrCrUrCrArUrGrUrUrGrAr<br>GrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCr<br>UrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>7         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>C10 | mG*mC*mU*rGrArUrGrGrCrCrArUrGrGrUrArArGrGrArGrUrUrGrA<br>rGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC<br>rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |
| 671<br>8         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>D10 | mU*mG*mU*rGrGrArArGrArGrArGrArArCrArUrUrUrGrUrUrGrA<br>rGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC<br>rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU   |
| 671<br>9         | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-<br>E10 | mC*mU*mG*rUrGrGrArArGrArGrArGrArArCrArUrUrUrGrUrUrGrA<br>rGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC<br>rUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr<br>UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*<br>mU |

10

20

30

40

【 0 5 2 5 】

【表 7 - 5】

| 配列番号 | エンティティ名                 | 配列                                                                                                                                                                                                                                           |
|------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                         | mU                                                                                                                                                                                                                                           |
| 6720 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-F10 | mU*mC*mU*rCrUrUrCrCrArCrArGrGrUrCrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                   |
| 6721 | MG3-6-TRBC1/2-sgRNA-G10 | mA*mG*mG*rUrCrArArGrArGrArArArGrGrArUrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                         |
| 6761 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-D3  | mA*mG*mG*rUrCrCrUrCrUrGrGrArArArGrGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU         |
| 6762 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-E3  | mC*mU*mG*rArArCrArArGrGrUrGrUrUrCrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU             |
| 6763 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-F3  | mC*mU*mC*rGrGrGrUrGrGrGrArArCrArCrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6764 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-G3  | mA*mA*mU*rGrGrGrArArGrGrArGrGrUrGrCrArCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6765 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-H3  | mG*mG*mG*rCrUrGrCrUrCrCrUrUrGrArGrGrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6766 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-A4  | mU*mA*mC*rUrGrCrCrUrGrArGrCrArGrCrCrGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6767 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-B4  | mU*mU*mG*rArCrArGrCrGrGrArArGrUrGrGrUrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6768 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-C4  | mG*mU*mG*rArCrGrGrGrUrUrUrGrGrCrCrCrUrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCr                                                                         |

【 0 5 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

| 配列番号 | エンティティ名                | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                        | CrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                         |
| 6769 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-D4 | mC*mG*mG*rCrGrCrUrGrArCrGrArUrCrUrGrGrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6770 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-E4 | mC*mC*mA*rArCrArGrUrGrUrCrCrUrArCrCrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6771 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-F4 | mC*mC*mU*rGrCrArGrArGrArGrArArArGrUrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6772 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-G4 | mC*mU*mG*rArArArArArCrGrUrGrUrUrCrCrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6773 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-H4 | mC*mU*mU*rGrGrGrUrGrGrGrArArCrArCrGrUrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6774 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-A5 | mA*mA*mU*rGrGrGrArArGrGrArGrGrUrGrCrArCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6775 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-B5 | mG*mG*mG*rCrUrGrCrUrCrCrUrUrGrArGrGrGrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6776 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-C5 | mU*mA*mC*rUrGrCrCrUrGrArGrCrArGrCrCrGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6777 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-D5 | mU*mU*mG*rArCrArGrCrGrGrArArGrUrGrGrUrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6778 | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-E5 | mG*mU*mG*rArCrArGrGrUrUrUrGrGrCrCrCrUrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrUrCrGrArArArGrArArArGrArArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

20

30

40

**【 0 5 2 7 】**

【表 7 - 7】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                  | エンティティ名                | 配列                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        | rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                        |
| 6779                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-F5 | mC*mG*mG*rCrGrCrUrGrArCrGrArUrCrUrGrGrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6780                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-G5 | mU*mC*mA*rArCrArGrArGrUrCrUrUrArCrCrArGrCrArGrUrUrGrArGrArUrCrUrUrCrGrArArGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6781                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-8-TRBC1/2-sgRNA-H5 | mU*mG*mU*rGrGrArArGrArGrArGrArArCrArUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrUrUrCrGrArArGrArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrGrCrUrCrCrUrCrUrUrArGrGrArArCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -O メチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |                        |                                                                                                                                                                                                                                        |

【 0 5 2 8 】

【表 8 - 1】

表 4 B : 実施例 10 で標的とした部位

| 配列番号 | エンティティ名                   | 配列                   |
|------|---------------------------|----------------------|
| 6722 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-A6 | AGGTCCTCTGGAAAGGGAAG |
| 6723 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-B6 | CAGGTCCTCTGGAAAGGGA  |
| 6724 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-C6 | CCACACTGGTGTGCCTGGCC |
| 6725 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-D6 | GAATGGGAAGGAGGTGCACA |
| 6726 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-E6 | TGAGGGCGGGCTGCTCCTTG |
| 6727 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-F6 | AGTATCTGGAGTCATTGAGG |
| 6728 | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-G6 | ATACTGCCTGAGCAGCCGCC |

【 0 5 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                   | 配列                   |
|------------------|---------------------------|----------------------|
| 672<br>9         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-H6 | TTGACAGCGGAAGTGGTTGC |
| 673<br>0         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-A7 | CTTGACAGCGGAAGTGGTTG |
| 673<br>1         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-B7 | CCGCTGTCAAGTCCAGTTCT |
| 673<br>2         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-C7 | TCGGAGAATGACGAGTGGAC |
| 673<br>3         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-D7 | CAGATCGTCAGCGCCGAGGC |
| 673<br>4         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-E7 | CGGCGCTGACGATCTGGGTG |
| 673<br>5         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-F7 | GCCAACAGTGTCTTACCAGC |
| 673<br>6         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-G7 | CTTCCCTAGCAGGATCTCAT |
| 673<br>7         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-H7 | ATACAGGGTGGCCTTCCCTA |
| 673<br>8         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-A8 | GGCGCTGACCAGCACAGCAT |
| 673<br>9         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-B8 | TCTCTTCTGCAGGTCAAGAG |
| 674<br>0         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-C8 | CCTGCAGAAGAGAAAGTTTT |
| 674<br>1         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-D8 | ACCTGCAGAAGAGAAAGTTT |
| 674<br>2         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-E8 | CCCACTGGTGTGCCTGGCC  |
| 674<br>3         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-F8 | ACCAGCTCAGCTCCACGTGG |
| 674<br>4         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-G8 | GAATGGGAAGGAGGTGCACA |
| 674<br>5         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-H8 | TGAGGGCGGGCTGCTCCTTG |
| 674<br>6         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-A9 | AGTATCTGGAGTCATTGAGG |
| 674<br>7         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-B9 | ATACTGCCTGAGCAGCCGCC |
| 674<br>8         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-C9 | TTGACAGCGGAAGTGGTTGC |
| 674<br>9         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-D9 | CTTGACAGCGGAAGTGGTTG |
| 675              | MG3-6-TRBC1/2-標的部         | CCGCTGTCAAGTCCAGTTCT |

【 0 5 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティティ名                    | 配列                   |
|------------------|----------------------------|----------------------|
| 0                | 位-E9                       |                      |
| 675<br>1         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-F9  | TCGGAGAATGACGAGTGGAC |
| 675<br>2         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-G9  | CAGATCGTCAGCGCCGAGGC |
| 675<br>3         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-H9  | CGGCGCTGACGATCTGGGTG |
| 675<br>4         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-A10 | GTCAACAGAGTCTTACCAGC |
| 675<br>5         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-B10 | CTTCCCTAGCAAGATCTCAT |
| 675<br>6         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-C10 | GCTGATGGCCATGGTAAGGA |
| 675<br>7         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-D10 | TGTGGAAGAGAGAACATTTT |
| 675<br>8         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-E10 | CTGTGGAAGAGAGAACATTT |
| 675<br>9         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-F10 | TCTCTTCCACAGGTCAAGAG |
| 676<br>0         | MG3-6-TRBC1/2-標的部<br>位-G10 | AGGTCAAGAGAAAGGATTCC |
| 678<br>2         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-D3  | AGGTCTCTGGAAAGGGAAG  |
| 678<br>3         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-E3  | CTGAACAAGGTGTTCCCACC |
| 678<br>4         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-F3  | CTCGGGTGGAACACCTTGT  |
| 678<br>5         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-G3  | AATGGGAAGGAGGTGCACAG |
| 678<br>6         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-H3  | GGGCTGCTCCTTGAGGGGCT |
| 678<br>7         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-A4  | TACTGCCTGAGCAGCCGCCT |
| 678<br>8         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-B4  | TTGACAGCGGAAGTGTTGC  |
| 678<br>9         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-C4  | GTGACGGGTTTGCCCTATC  |
| 679<br>0         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-D4  | CGGCGCTGACGATCTGGGTG |
| 679<br>1         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-E4  | CCAACAGTGTCTTACCAGCA |
| 679<br>2         | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-F4  | CCTGCAGAAGAGAAAGTTTT |

【 0 5 3 1 】

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

| 配列番号 | エンティティ名                   | 配列                   |
|------|---------------------------|----------------------|
| 6793 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-G4 | CTGAAAAACGTGTTCCCACC |
| 6794 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-H4 | CTTGGGTGGGAACACGTTTT |
| 6795 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-A5 | AATGGGAAGGAGGTGCACAG |
| 6796 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-B5 | GGGCTGCTCCTTGAGGGGCT |
| 6797 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-C5 | TACTGCCTGAGCAGCCGCCT |
| 6798 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-D5 | TTGACAGCGGAAGTGGTTGC |
| 6799 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-E5 | GTGACAGGTTTGGCCCTATC |
| 6800 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-F5 | CGGCGCTGACGATCTGGGTG |
| 6801 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-G5 | TCAACAGAGTCTTACCAGCA |
| 6802 | MG3-8-TRBC1/2-標的部<br>位-H5 | TGTGGAAGAGAGAACATTTT |

10

20

## 【0532】

実施例 11 - mRNA トランスフェクションを使用するマウス HAO-1 遺伝子の MG3-6 ガイドスクリーニング

MG3-6 のガイドは、適切な PAM 配列を検索するガイド発見アルゴリズムを使用して、ヒト HAO1 遺伝子のエクソン 1、2、3、及び 4 において特定された。哺乳類細胞における評価のために合計 19 個のガイドを選択した。300 ng の mRNA 及び 120 ng の単一ガイド RNA を、以下のように Hepa1-6 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの 1 日前に、Pen / Step を含まない DMEM、10% FBS、1 × NEAA 培地中で 10 日未満培養した Hepa1-6 細胞を、TC 処理した 24 ウェルプレートに播種した。細胞を計数し、60,000 個の生細胞と同等の体積を各ウェルに加えた。更に予め平衡化した培地を各ウェルに加えて、総体積を 500 µL にした。トランスフェクション当日、25 µL の OptiMEM 培地と 1.25 µL の Lipofectamine Messenger Max Solution (ThermoFisher) をマスターミックス溶液中で混合し、ボルテックスし、室温で少なくとも 5 分間置いた。別個のチューブにおいて、300 ng の MG3-6 mRNA 及び 120 ng の sgRNA を、25 µL の OptiMEM 培地と一緒に混合し、軽くボルテックスした。適切な量の Messenger Max 溶液を各 RNA 溶液に添加し、チューブをはじくようにして混合し、低速で短時間スピンドウンした。完全な編集試薬溶液を、室温で 10 分間インキュベートし、次いで Hepa1-6 細胞に直接加えた。トランスフェクションの 2 日後、培地を Hepa1-6 細胞の各ウェルから吸引除去し、MagMAX (商標) DNA マルチサンプルウルトラ 2.0 キットを用いた KingFisher Flex による自動磁気ビーズ精製により、ゲノム DNA を精製した。ガイドの活性を、表 5 A 及び図 5 に要約し、一方、使用したプライマーを表 5 B に要約する。

30

40

## 【0533】

50

【表 9】

表 5 A : mRNA トランスフェクションにより送達されたマウス HAO 1 における MG 3  
ー 6 ガイドの平均活性

| ガイド名    | PAM     | 配列番号  | スパーサー配列                 | 編集活性<br>(平均インデル%) |
|---------|---------|-------|-------------------------|-------------------|
| mH36-1  | GCAGACC | 11802 | CATGCTGTTTCATAATCACTGAT | 0                 |
| mH36-2  | ACAGGTC | 11803 | CAGAAGTCAGTGTATGACTATT  | 12.5              |
| mH36-3  | CCAGACC | 11804 | TAACGTCTCCTGATCATTTGCC  | 0                 |
| mH36-4  | ACAGATC | 11805 | CTCTGTCCTAAAACAGAAGTTG  | 25                |
| mH36-5  | TGGGGCT | 11806 | GAGTCAGCATGCCAATATGTGT  | 33.5              |
| mH36-6  | TCAGACC | 11807 | TTCTCCATTTCATTACAGCCTG  | 0                 |
| mH36-7  | ACAGGCT | 11808 | TCATGCCAGTTCCCATGGTCTG  | 0                 |
| mH36-8  | TTGGGCT | 11809 | GAAGTGGCATGATGCTGAGTTC  | 5                 |
| mH36-9  | CTGGGCC | 11810 | AGTTGCATCCAGCGAAGTGCCT  | 28                |
| mH36-10 | AAAGACC | 11811 | CTGGATGCAACTGTACATCTAC  | 0                 |
| mH36-11 | TGAGATC | 11812 | AACTGTACATCTACAAAGACCG  | 0                 |
| mH36-12 | CAGGGTT | 11813 | GATAGTGAAGCGAGCTGAGAAG  | 45.5              |
| mH36-13 | CAAGGCC | 11814 | AGCGAGCTGAGAAGCAGGGTTA  | 27.5              |
| mH36-14 | ACAGGTT | 11815 | AACCGCATTGATGACGTGCGGA  | 0                 |
| mH36-15 | TCAGGTC | 11816 | AGGTTCAAGCTGCCACCACAAC  | 41.5              |
| mH36-16 | GTGGACT | 11817 | AAGGGAAATTTTGAGACAACA   | 0                 |
| mH36-17 | ATAGACC | 11818 | TGCTGAATATGTGGCACAAGCT  | 0                 |
| mH36-18 | ATGGGTC | 11819 | GTAATATCATCCAGCTGAGAG   | 35                |
| mH36-19 | AGAGGTT | 11820 | TATTGTTGTAAAGGGCATTG    | 21                |

【 0 5 3 4 】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 5 B : 最初の 4 つのエクソンの各々で P C R に使用され、サンガーシーケンシングに使用される、マウス H A O 1 遺伝子用に設計したプライマー

| 標的エクソン             | 使用        | プライマー名            | 配列番号  | プライマー配列                      |
|--------------------|-----------|-------------------|-------|------------------------------|
| マウス H A O 1 エクソン 1 | フォワード PCR | PCR_mHE1_F_+233   | 11821 | GTGACCAACCCTACCCGTTT         |
|                    | リバーズ PCR  | PCR_mHE1_R_-553   | 11822 | GCAAGCACCTACTGTCTCGT         |
|                    | シーケンシング   | Seq_mHE1_F_+139   | 11823 | GTCTAGGCATACAATGTTTGCTC<br>A |
| マウス H A O 1 エクソン 2 | フォワード PCR | HAO1_E2_F5721     | 11824 | CAACGAAGGTTCCTCCAGG          |
|                    | リバーズ PCR  | HAO1_E2_R6271     | 11825 | GGAAGGGTGTTTCGAGAAGGA        |
|                    | シーケンシング   | 5938F Seq_HAO1_E2 | 11826 | CTATGCAAGGAAAAGATTGTC<br>C   |
| マウス H A O 1 エクソン 3 | フォワード PCR | HAO1_E3_F23198    | 11827 | TGCCCTAGACAAGCTGACAC         |
|                    | リバーズ PCR  | HAO1_E3_R23879    | 11828 | CAGATTCTGGAAGTGGCCCA         |
|                    | シーケンシング   | HAO1_E3_F23198    | 11827 | フォワード PCR プライマーと同じ           |
| マウス H A O 1 エクソン 4 | フォワード PCR | PCR_mHE4_F_+300   | 11829 | GGCTGGCTGAAAATAGCATCC        |
|                    | リバーズ PCR  | HAO1_E4_R31650    | 11830 | AGGTTTGTTCCCTCACCT           |
|                    | シーケンシング   | PCR_mHE4_R_-149   | 11831 | TCTGCCATGAAGGCATATGGAC       |

## 【 0 5 3 5 】

実施例 1 2 - M G 3 - 6 タイプ I I ヌクレアーゼのガイド化学最適化（予測）

様々な化学修飾ガイドが設計され、活性について試験される。マウス肝細胞（H e p a 1 - 6 細胞）のガイドスクリーニングにおける最も活性なガイドーアルブミンイントロン 1 を標的とする一が、様々な化学修飾を挿入するためのスペーサー配列モデルとして選択される。g R N A は、5 ' に位置するスペーサー、それに続く C R I S P R リピート及びトランス活性化 C R I S P R R N A ( t r a c r ) を含む。C R I S P R リピート及び t r a c r は、M G 3 - 6 と同一である。C R I S P R リピート及び t r a c r は、3 つのステムループを含む構造化 R N A を形成する。リボースの 2 ' ヒドロキシルを 2 ' - O - メチル基で置換するか、又はホスホジエステル骨格をホスホロチオエート（P S）結合で置換することによって、ステムループの異なる領域を修飾した。更に、ガイドの 5 ' のス

パーサーは、2'-O-メチル、PS結合、及び2'-フルオロを付加することによって修飾される。全く同じ塩基配列を有するが、異なる化学修飾を有するガイドの編集活性を、MG3-6をコードするmRNAとガイドの共トランスフェクションによってHepa1-6細胞で評価する。同じ塩基配列及びAltR1/AltR2と呼ばれる市販の化学修飾を有するガイドを、対照として使用する。これらのガイドにおけるパーサー配列は、マウスゲノムのアルブミンイントロン1の22ヌクレオチド領域を標的とする。

#### 【0536】

化学修飾を有さないガイド（天然RNA）と比較した、化学修飾ガイドの安定性を試験するために、細胞粗抽出物を使用した安定性アッセイを使用される。ガイドRNAが、インビトロ又はインビボで哺乳類細胞に送達したとき曝露されるヌクレアーゼの混合物を含むため、哺乳類細胞からの粗細胞抽出物が選択された。Hepa1-6細胞を、コンフルエント細胞の15cmのディッシュ当たり3mLの冷PBSを加え、細胞スクレーパーを使用してディッシュの表面から細胞を放出することによって収集する。細胞を、10分間、200gでペレット化し、将来的な使用のため-80℃で凍結する。安定性アッセイのため、細胞を4体積の冷PBS中に再懸濁する（例えば、100mgのペレットでは、細胞を400μLの冷PBS中に再懸濁する）。Triton X-100を、0.2%（v/v）の濃度で加え、細胞を10秒間ボルテックスし、10分間氷上に置き、10秒間再びボルテックスする。Triton X-100は、細胞膜を破壊するが、使用した濃度ではタンパク質を不活化又は変性しない、マイルドな非イオン性界面活性剤である。安定性反応物を氷上でセットアップし、2pmoleの各ガイド（2μMストックの1μL）とともに20μLの細胞粗抽出物を含む。1ガイド当たり6つの反応が設定され：入力、0.5時間、1時間、4時間、9時間、及び場合により21時間を含む（時間単位の時間は、各試料をインキュベートする時間の長さを指している）。試料を0.5時間～最大21時間、37℃でインキュベートし、一方、入力対照は氷上に5分間置く。各インキュベーション期間の後、反応を、フェノールとグアニジンチオシアネートの混合物（Tri試薬、Zymo Research）300μLを加えることによって停止させ、これにより全てのタンパク質を直ちに変性させ、リボヌクレアーゼを効率的に阻害し、その後のRNAの回収を促進する。Tri試薬を添加した後、試料を15秒間ボルテックスし、-20℃で保存する。RNAを、Direct-zol RNAミニプレップキット（Zymo Research）を使用して試料から抽出し、100μLのヌクレアーゼを含まない水で溶出する。修飾ガイドの検出は、Taqman miRNAアッセイ技術（Thermo Fisher）を使用する、Taqman RT-qPCRを使用して実行される。データを、入力試料に対する残りのsgRNAのパーセンテージの関数としてプロットする。

#### 【0537】

実施例13-T細胞におけるmRNAエレクトロポレーションの効率

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット（Miltenyi）を使用して、PBMCから初代T細胞を精製した。mRNAのヌクレオフェクションを以下に行った：200,000個の細胞に、Lonza 4Dエレクトロポレーター（DS-120）を使用して、500ngのmRNA及び示される量のガイドRNAで共トランスフェクトした。初めのトランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。「+gRNA」と標識された条件について、最初のトランスフェクションの15時間後、細胞を、示される量の追加のガイドでヌクレオフェクションした。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを作製し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専有のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図6）。

#### 【0538】

実施例14-既存の抗体応答を評価するELISAアッセイ

MG3-6及びMG3-8は、Expi293（商標）Expression系K

10

20

30

40

50

it (ThermoFisher Scientific) を使用してヒトHEK293細胞中で発現され、精製された。簡潔には、293細胞を、強力なウイルスプロモーターによって駆動されるヌクレアーゼをコードするプラスミドでリポフェクションした。細胞を攪拌しながら懸濁培養物中で増殖させ、トランスフェクションの2日後に採取した。ヌクレアーゼタンパク質を6-His親和性タグに融合し、金属親和性クロマトグラフィーによって50～60%の純度に精製した。並行して溶解物をモックトランスフェクト細胞から作製し、同一の金属親和性クロマトグラフィープロセスに供した。Cas9はIDTから購入し、>95%純粋であった。

#### 【0539】

MaxiSorp (登録商標) ELISAプレート (Thermo Scientific) を、1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈した0.5 μgのヌクレアーゼ又は対照タンパク質でコーティングし、室温で一晩インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich) / 1×PBS溶液 (1% BSA-PBS) とともに室温で1時間インキュベートした。別の洗浄ステップの後、ウェルを、無作為に選択されたドナーから採取した50個を超える別個の血清試料 (1% BSA-PBS中1:50希釈) とともに室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄し、1% BSA-PBS中で1:50,000に希釈されたペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト (Fcγ断片特異的) 二次抗体 (Jackson Immuno Research) とともに室温で1時間インキュベートした。アッセイは、製造業者の仕様に従って、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) 液体基質系キット (Sigma-Aldrich) を使用して開発された。抗体力価は、450 nmで測定された吸光度値として報告する (図7)。この抗原に対するワクチン接種が広く普及しているため破傷風トキソイドを陽性対照として使用し、Sigma Aldrichから購入した。

#### 【0540】

実施例15-ヒト末梢血B細胞におけるTRACのDNA及び細胞表面タンパク質レベルでの遺伝子編集結果

ヒト末梢血B細胞を、STEMCELL Technologiesから購入し、ヌクレオフェクションの前にImmunoCult (商標) ヒトB細胞増殖キットを使用して2日間増殖させた。MG3-6 RNP (106 pmolのタンパク質/160 pmolのガイド) のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用してB細胞 (200,000) に行った。ヌクレオフェクション後の細胞を、Virovekから入手したAAV-6を含有する培地中に直ちに回収した。トランスフェクションの5日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGS分析のために、NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを使用して、TRAC 6ガイドRNA (配列番号6804) の標的配列を増幅した。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専有のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した。フローサイトメトリーによる分析のため、100,000個の細胞を、生存率、B細胞表面マーカーCD19 (CD19モノクローナル抗体 (HIB19)、APC、eBioscience (商標)) の発現、及びtLNGFR (CD271 (LNGFR) 抗体、抗ヒト、REAfinity (商標)) の発現によって測定される導入遺伝子 (配列番号6810) 挿入について染色した。細胞を4℃で30分間染色し、Attune NxTフローサイトメーターでデータを取得した。tLNGFRを発現する細胞を、単一の生CD19+細胞上でゲーティングした (図8)。

#### 【0541】

## 【表 1 1】

表 6：実施例 1 5 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6804 | MG3-6-TRAC-sgRNA-6 | mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

## 【0 5 4 2】

実施例 1 6－造血幹細胞（HSC）における TRAC 及び AAVS1 の DNA レベルでの遺伝子編集結果

動員された末梢血 CD34+ 細胞を、All Cells から取得し、ヌクレオフェクションの前に、StemSpan（商標）CC110 サイトカインカクテルを補充した STEM CELL StemSpan（商標）SFEM II 培地中で 48 時間培養した。MG3-6 RNP（標準用量の場合は 106 pmol のタンパク質／120 pmol のガイド、半分用量の場合は 52 pmol のタンパク質／60 pmol のガイド）のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して HSC（200, 000）に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。Sanger 及び NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した（配列番号 6804、6806、及び 6808）。NGS アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専有の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した。ICE アンプリコンは、サンガーシーケンシングのために Elim Biopharmaceuticals Inc. に送られ、遺伝子編集を測定するために専有の Python スクリプトで分析された（図 9）。

20

## 【0 5 4 3】

## 【表 1 2】

表 7：実施例 1 6 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名              | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6804 | MG3-6-TRAC-sgRNA-6   | mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6806 | MG3-6-AAVS1-sgRNA-B2 | mA*mG*mG*rArArUrCrUrGrCrCrUrArArCrArGrGrArGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6808 | MG3-6-AAVS1-sgRNA-D2 | mU*mA*mG*rGrArArGrGrArGrGrArGrGrCrCrUrArArGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

40

## 【0 5 4 4】

実施例 1 7－リボ核タンパク質として送達された MG3-6 の人工多能性幹細胞（iPS

50

C)におけるTRACのDNA及び細胞表面タンパク質レベルでの遺伝子編集結果

A T C C - B X S 0 1 1 6 ヒト (非ヒスパニック系白人女性)

【0545】

人工多能性幹 (IPS) 細胞を、ヌクレオフェクションの前に、10  $\mu$ M の ROCK 阻害剤 Y-27632 を含む mTESR Plus 培地 (STEMCELL Technologies) 中、Corning Matrigel でコーティングされたプラスチックウェア上で24時間培養する。MG3-6 RNP (106 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用して iPSC (200, 000) に行った。トランスフェクションの5日後にフローサイトメトリー及びゲノムDNA抽出のために、Accutase を用いて細胞を採取した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを使用して、TRAC 6 gRNA の個々の標的配列を増幅した (配列番号6804)。アンプリコンをIllumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専有のPython スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した。フローサイトメトリーによる分析のため、ヌクレオフェクションの5日後に試料当たり100, 000個の iPSC を、LIVE / DEAD (商標) Fixable Near-IR Dead Cell Stain キット及びCD271 (LNGFR) 抗体、抗ヒト、REAFinity (商標) で染色して、生存率及び導入遺伝子 (配列番号6810) 挿入をそれぞれ測定した。細胞を固定し、透過処理し (Inside Stain Kit、Miltenyi)、多能性転写因子 Oct 4 及び Sox 2 (抗 Oct 3 / 4 アイソフォーム A-APC、ヒト及びマウス REA338 1、Anti-Sox 2-FITC、ヒト及びマウス REA320) について更に染色した。細胞を Attune NxT フローサイトメーターで取得し、単一の生きた Oct 4 + Sox 2 + 細胞上のゲーティングに基づいて、tLNGFR 発現について分析した (図10)。

【0546】

【表13】

表8：実施例17で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                           |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6804 | MG3-6-TRAC-sgRNA-6 | mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

【0547】

実施例18-mRNAとして送達されたMG3-6の人工多能性幹細胞 (iPSC) におけるTRACのDNAタンパク質レベルでの遺伝子編集結果

A T C C - B X S 0 1 1 6 ヒト (非ヒスパニック系白人女性)

【0548】

人工多能性幹 (IPS) 細胞を、ヌクレオフェクションの前に、10  $\mu$ M の ROCK 阻害剤 Y-27632 を含む mTESR Plus (STEMCELL Technologies) 中、Corning Matrigel でコーティングされたプラスチックウェア上で24時間培養する。MG3-6 RNP (106 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) 又は mRNA (250 若しくは 500 ng の mRNA / 12 pmol のガイド) のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用して iPSC (200, 000) に行った。トランスフェクションの5日後にゲノムDNA抽出のために Accutase を用いて細胞を採取した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを使用して、TRAC 6 gRNA の個々の標

的配列を増幅した（配列番号6804）。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専有のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図11）。

【0549】

【表14】

表9：実施例18で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6804 | MG3-6-TRAC-sgRNA-6 | mC*mG*mA*rArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUrGrArArArGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

【0550】

実施例19－CD2のDNAレベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット（Miltenyi）を使用して、PBMCから初代T細胞を精製した。MG3-6 RNP（106 pmolのタンパク質／160 pmolのガイド）のヌクレオフェクションを、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用してT細胞（200,000）に行った。トランスフェクションの5日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを作製し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専有のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図12）。

20

【0551】

30

40

50

## 【表 15 - 1】

表 10A : 実施例 19 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6811 | MG3-6-CD2-sgRNA-A1 | mA*mU*mU*rUrArCrArUrGrGrArArArGrCrUrCrArUrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6812 | MG3-6-CD2-sgRNA-B1 | mU*mU*mU*rUrUrArUrArGrGrUrGrCrArGrUrCrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6813 | MG3-6-CD2-sgRNA-C1 | mU*mG*mC*rCrUrUrGrGrArArArCrUrGrGrGrUrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6814 | MG3-6-CD2-sgRNA-D1 | mG*mG*mG*rArArArArArCrUrUrCrArGrArCrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 6815 | MG3-6-CD2-sgRNA-E1 | mU*mU*mG*rCrArCrArArUrUrCrArGrArArArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 6816 | MG3-6-CD2-sgRNA-F1 | mG*mA*mA*rCrUrCrUrGrArArArArUrUrArArGrCrArUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6817 | MG3-6-CD2-sgRNA-G1 | mU*mG*mU*rUrGrGrArArArArArUrArUrUrUrGrArUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 6818 | MG3-6-CD2-sgRNA-H1 | mU*mG*mA*rUrGrUrCrCrUrGrArCrCrArArGrGrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6819 | MG3-6-CD2-sgRNA-A2 | mC*mC*mA*rArGrGrCrArUrUrCrGrUrArArUrCrUrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6820 | MG3-6-CD2-sgRNA-B2 | mU*mU*mU*rUrArGrArGrArGrGrUrCrUrCrArArArArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU         |

10

20

30

40

【0552】

【表 15 - 2】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                    | *mU*mU                                                                                                                                                                                                                           |
| 6821 | MG3-6-CD2-sgRNA-C2 | mG*mG*mG*rUrCrUrCrArArArArCrCrArArArGrArUrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6822 | MG3-6-CD2-sgRNA-D2 | mG*mG*mA*rArArCrArUrCrUrArArArArCrUrUrUrCrUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6823 | MG3-6-CD2-sgRNA-E2 | mC*mU*mC*rArGrArGrGrUrCrArUrCrArCrArCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU        |
| 6824 | MG3-6-CD2-sgRNA-F2 | mC*mC*mG*rCrCrArCrGrCrArCrCrUrGrGrArCrArGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6825 | MG3-6-CD2-sgRNA-G2 | mU*mG*mG*rArCrArGrCrUrGrArCrArGrGrCrUrCrGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6826 | MG3-6-CD2-sgRNA-H2 | mG*mC*mU*rGrUrGrCrArCrUrUrGrArArUrUrUrGrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU      |
| 6827 | MG3-6-CD2-sgRNA-A3 | mU*mU*mU*rArGrArUrGrUrUrUrCrCrCrArUrCrUrUrGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6828 | MG3-6-CD2-sgRNA-B3 | mC*mC*mA*rUrCrUrUrGrArUrArCrArGrGrUrUrUrArArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6829 | MG3-6-CD2-sgRNA-C3 | mG*mG*mU*rCrArGrUrUrCrCrArUrUrCrArUrUrArCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU    |
| 6830 | MG3-6-CD2-sgRNA-D3 | mU*mU*mC*rCrArUrUrCrArUrUrArCrCrUrCrArCrArGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr                                                           |

【0553】

10

20

30

40

50

【表 15-3】

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                    | UrUrUrUrCrCrArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU                                                                                                                                                                                     |
| 683<br>1 | MG3-6-CD2-sgRNA-E3 | mG*mG*mG*rUrUrGrUrGrUrUrGrArUrArCrArArGrUrCrCrArGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 683<br>2 | MG3-6-CD2-sgRNA-F3 | mA*mA*mG*rUrCrCrArGrGrArGrArUrCrUrUrUrGrGrUrUrUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 683<br>3 | MG3-6-CD2-sgRNA-G3 | mG*mG*mC*rArGrCrArUrCrCrUrUrGrGrCrCrArGrArGrUrArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 683<br>4 | MG3-6-CD2-sgRNA-H3 | mG*mC*mC*rArGrArGrUrArArUrGrGrGrCrUrCrUrCrUrGrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 683<br>5 | MG3-6-CD2-sgRNA-A4 | mC*mA*mC*rUrUrCrUrCrUrUrCrCrUrUrUrGrCrArGrArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU     |
| 683<br>6 | MG3-6-CD2-sgRNA-B4 | mU*mA*mU*rArGrArArArArCrGrArGrCrArGrUrGrCrCrArCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 683<br>7 | MG3-6-CD2-sgRNA-C4 | mA*mG*mC*rArGrUrGrCrCrArCrArArArGrArCrCrArUrCrArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 683<br>8 | MG3-6-CD2-sgRNA-D4 | mA*mU*mG*rCrCrArArUrGrArUrGrArGrArUrArGrArUrGrUrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 683<br>9 | MG3-6-CD2-sgRNA-E4 | mG*mA*mA*rGrArGrArArGrUrGrGrGrArUrGrGrCrUrGrGrGrGrUrU<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrAr<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*m<br>U*mU*mU |
| 684<br>0 | MG3-6-CD2-sgRNA-F4 | mC*mC*mA*rCrArGrArGrUrArGrCrUrArCrUrGrArArGrArArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU                                                                                                                                |

10

20

30

40

【0554】

50

【表 15 - 4】

| 配列番号     | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                              |
|----------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                    | rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU                                                                                                              |
| 684<br>1 | MG3-6-CD2-sgRNA-G4 | mC*mG*mU*rGrUrUrCrArGrCrArCrCrArGrCrCrUrCrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 684<br>2 | MG3-6-CD2-sgRNA-H4 | mG*mG*mG*rCrArCrArCrArArGrUrUrCrArCrCrArGrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 684<br>3 | MG3-6-CD2-sgRNA-A5 | mC*mA*mG*rCrArGrArArArGrGrCrCrCrGrCrCrCrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 684<br>4 | MG3-6-CD2-sgRNA-B5 | mU*mG*mA*rGrUrUrUrUrCrUrGrCrUrGrCrCrCrArUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 684<br>5 | MG3-6-CD2-sgRNA-C5 | mA*mU*mG*rGrGrGrArGrGrUrUrUrUrGrGrCrUrGrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU       |
| 684<br>6 | MG3-6-CD2-sgRNA-D5 | mU*mG*mA*rArCrUrCrGrArGrGrUrCrUrGrGrGrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU         |
| 684<br>7 | MG3-6-CD2-sgRNA-E5 | mA*mA*mC*rUrUrGrUrGrUrGrCrCrCrGrArCrGrGrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 684<br>8 | MG3-6-CD2-sgRNA-F5 | mC*mG*mA*rCrGrGrArGrCrArGrGrArGrGrCrCrUrCrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 684<br>9 | MG3-6-CD2-sgRNA-G5 | mG*mG*mA*rGrGrArGrGrArUrGrUrUrGrGrGrArArGrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 685      | MG3-6-CD2-sgRNA-H5 | mG*mU*mU*rGrGrGrArArGrUrUrGrCrUrGrGrArUrUrCrUrGrGrUrUr                                                                                                                                                                          |

10

20

30

40

【0555】

【表 15 - 5】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                                                                                                                                                                                                                                                    |                    | rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                        |
| 6851                                                                                                                                                                                                                                                                 | MG3-6-CD2-sgRNA-A6 | mA*mG*mG*rGrGrUrUrGrArArGrCrUrGrGrArArUrUrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6852                                                                                                                                                                                                                                                                 | MG3-6-CD2-sgRNA-B6 | mC*mC*mC*rUrUrUrCrUrUrCrArGrUrArGrCrUrArCrUrCrUrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば、mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -Oメチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば、fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |                    |                                                                                                                                                                                                                                |

【0556】

【表 16 - 1】

表 10B : 実施例 19 で標的とした部位

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                     |
|------|-------------------|------------------------|
| 6853 | MG3-6-CD2-標的部位-A1 | ATTACATGGAAAGCTCATCTT  |
| 6854 | MG3-6-CD2-標的部位-B1 | TTTTATAGGTGCAGTCTCCAA  |
| 6855 | MG3-6-CD2-標的部位-C1 | TGCCTTGAAACCTGGGGTGCC  |
| 6856 | MG3-6-CD2-標的部位-D1 | GGGAAAAAACTTCAGACAAGAA |
| 6857 | MG3-6-CD2-標的部位-E1 | TTGCACAATTCAGAAAAGAGAA |
| 6858 | MG3-6-CD2-標的部位-F1 | GAACCTGAAAATTAAGCATCT  |
| 6859 | MG3-6-CD2-標的部位-G1 | TGTTGGAAAAAATATTTGATTT |
| 6860 | MG3-6-CD2-標的部位-H1 | TGATGTCCTGACCCAAGGCACC |
| 6861 | MG3-6-CD2-標的部位-A2 | CCAAGGCATTCTGAATCTCTTT |
| 6862 | MG3-6-CD2-標的部位-B2 | TTTAGAGAGGGTCTCAAAACC  |

【0557】

10

20

30

40

50

【表 16-2】

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------|-------------------|-------------------------|
| 6863 | MG3-6-CD2-標的部位-C2 | GGGTCTCAAACCAAAGATCTC   |
| 6864 | MG3-6-CD2-標的部位-D2 | GGAAACATCTAAACTTTCTCA   |
| 6865 | MG3-6-CD2-標的部位-E2 | CTCAGAGGGTCATCACACACAA  |
| 6866 | MG3-6-CD2-標的部位-F2 | CCGCCACGCACCTGGACAGCTG  |
| 6867 | MG3-6-CD2-標的部位-G2 | TGGACAGCTGACAGGCTCGACA  |
| 6868 | MG3-6-CD2-標的部位-H2 | GCTGTGCACTTGAATTTTGAC   |
| 6869 | MG3-6-CD2-標的部位-A3 | TTTAGATGTTTCCCATCTTGAT  |
| 6870 | MG3-6-CD2-標的部位-B3 | CCATCTTGATACAGGTTTAATT  |
| 6871 | MG3-6-CD2-標的部位-C3 | GGTCAGTTCCATTACCTACCTC  |
| 6872 | MG3-6-CD2-標的部位-D3 | TTCCATTACCTACCTCACAGGT  |
| 6873 | MG3-6-CD2-標的部位-E3 | GGGTTGTGTTGATACAAGTCCA  |
| 6874 | MG3-6-CD2-標的部位-F3 | AAGTCCAGGAGATCTTTGGTTT  |
| 6875 | MG3-6-CD2-標的部位-G3 | GGCAGCATCCTTGGCCAGAGTA  |
| 6876 | MG3-6-CD2-標的部位-H3 | GCCAGAGTAATGGGCTCTCTGC  |
| 6877 | MG3-6-CD2-標的部位-A4 | CACTTCTCTCCTTTTGACAGAG  |
| 6878 | MG3-6-CD2-標的部位-B4 | TATAGAAAACGAGCAGTGCCAC  |
| 6879 | MG3-6-CD2-標的部位-C4 | AGCAGTGCCACAAAGACCATCA  |
| 6880 | MG3-6-CD2-標的部位-D4 | ATGCCAATGATGAGATAGATGT  |
| 6881 | MG3-6-CD2-標的部位-E4 | GAAGAGAAGTGGGATGGCTGGG  |
| 6882 | MG3-6-CD2-標的部位-F4 | CCACAGAGTAGCTACTGAAGAA  |
| 6883 | MG3-6-CD2-標的部位-G4 | CGTGTTACAGCACCAGCCTCAGA |
| 6884 | MG3-6-CD2-標的部位-H4 | GGGCACACAAGTTCACCAGCAG  |
| 6885 | MG3-6-CD2-標的部位-A5 | CAGCAGAAAGGCCCCGCCCTCC  |
| 6886 | MG3-6-CD2-標的部位-B5 | TGAGTTTTCTGCTGCCCCATGG  |

【0558】

10

20

30

40

50

【表 1 6 - 3】

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                     |
|------|-------------------|------------------------|
| 6887 | MG3-6-CD2-標的部位-C5 | ATGGGGAGGTTTTGGCTGAACT |
| 6888 | MG3-6-CD2-標的部位-D5 | TGAACTCGAGGTCTGGGGAGGG |
| 6889 | MG3-6-CD2-標的部位-E5 | AACTTGTGTGCCCCACGGAGCA |
| 6890 | MG3-6-CD2-標的部位-F5 | CGACGGAGCAGGAGGCCTCTTC |
| 6891 | MG3-6-CD2-標的部位-G5 | GGAGGAGGATGTTGGGAAGTTG |
| 6892 | MG3-6-CD2-標的部位-H5 | GTTGGGAAGTTGCTGGATTCTG |
| 6893 | MG3-6-CD2-標的部位-A6 | AGGGGTTGAAGCTGGAATTTGG |
| 6894 | MG3-6-CD2-標的部位-B6 | CCCTTTCTTCAGTAGCTACTCT |

10

## 【0559】

20

実施例 20 - CD5 の DNA レベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット (Miltenyi) を使用して、P BMC から初代 T 細胞を精製した。MG3-6 RNP (106 pmol のタンパク質 / 160 pmol のガイド) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して T 細胞 (200,000) に行った。トランスフェクションの 5 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 13)。

30

## 【0560】

【表 1 7 - 1】

表 1 1 A : 実施例 20 で使用されるガイド配列

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6895 | MG3-6-CD5-sgRNA-A1 | mA*mG*mA*rArGrGrCrCrArGrArArArCrCrArUrGrCrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 689  | MG3-6-CD5-sgRNA-B1 | mG*mU*mA*rCrArArGrGrUrGrGrCrCrArGrCrGrGrUrUrGrCrGrUrUr                                                                                                                                                                         |

40

## 【0561】

50

【表 17-2】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                          |
|------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6    |                    | GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU                                                       |
| 6897 | MG3-6-CD5-sgRNA-C1 | mU*mU*mC*rUrGrArCrCrCrCrArGrArUrUrUrCrCrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6898 | MG3-6-CD5-sgRNA-D1 | mC*mA*mC*rCrCrGrUrUrCrCrArArCrUrCrGrArArGrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6899 | MG3-6-CD5-sgRNA-E1 | mA*mC*mU*rCrGrArArGrUrGrCrCrArGrGrCrCrArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6900 | MG3-6-CD5-sgRNA-F1 | mG*mC*mA*rCrArUrGrGrUrUrUrGrCrArGrCrCrArGrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6901 | MG3-6-CD5-sgRNA-G1 | mG*mG*mG*rCrCrGrGrArGrCrUrCrCrArArGrCrArGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6902 | MG3-6-CD5-sgRNA-H1 | mC*mU*mC*rArArUrCrArUrCrUrGrCrUrArCrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6903 | MG3-6-CD5-sgRNA-A2 | mC*mA*mG*rArArArUrGrArCrArUrGrUrGrUrCrArCrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6904 | MG3-6-CD5-sgRNA-B2 | mG*mG*mC*rUrGrGrCrUrArGrUrUrArCrCrCrArCrCrUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6905 | MG3-6-CD5-sgRNA-C2 | mG*mC*mU*rArGrUrUrArCrCrCrArCrCrUrArArGrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |

10

20

30

40

【0562】

50

【表 17-3】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6906 | MG3-6-CD5-sgRNA-D2 | mU*mG*mA*rGrGrUrGrUrGrUrArGrGrUrGrArCrArArGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6907 | MG3-6-CD5-sgRNA-E2 | mG*mU*mG*rUrArGrGrUrGrArCrArArGrGrArArGrGrGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6908 | MG3-6-CD5-sgRNA-F2 | mG*mC*mA*rCrCrCrArCrArGrUrUrCrArGrCrCrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6909 | MG3-6-CD5-sgRNA-G2 | mU*mG*mG*rCrArGrArCrUrUrUrGrArCrGrCrUrUrGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6910 | MG3-6-CD5-sgRNA-H2 | mC*mC*mA*rUrGrUrGrCrCrArUrCrCrGrUrCrCrUrUrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6911 | MG3-6-CD5-sgRNA-A3 | mG*mG*mU*rGrArGrCrCrUrUrGrCrCrUrGrGrArArArUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6912 | MG3-6-CD5-sgRNA-B3 | mC*mA*mG*rArArGrArCrArArCrArCrUrCrCrArArCrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6913 | MG3-6-CD5-sgRNA-C3 | mC*mA*mA*rCrUrCrCrArGrArGrCrCrCrArCrArGrGrUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6914 | MG3-6-CD5-sgRNA-D3 | mG*mG*mG*rCrUrCrUrGrGrArGrUrUrGrUrGrGrUrGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6915 | MG3-6-CD5-sgRNA-E3 | mU*mG*mU*rCrGrUrUrGrGrArGrGrUrGrUrUrGrUrCrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

【0563】

10

20

30

40

50

【表 17-4】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                             |
|------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                    | U*mU*mU                                                                                                                                                                                                                        |
| 6916 | MG3-6-CD5-sgRNA-F3 | mC*mU*mC*rUrCrUrCrCrUrCrUrCrCrUrArGrCrUrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6917 | MG3-6-CD5-sgRNA-G3 | mG*mC*mC*rUrGrGrGrGrGrUrArCrCrArUrCrArGrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6918 | MG3-6-CD5-sgRNA-H3 | mC*mC*mA*rUrCrArGrCrUrArUrGrArGrGrCrCrCrArGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6919 | MG3-6-CD5-sgRNA-A4 | mC*mU*mA*rUrGrArGrGrCrCrCrArGrGrArCrArArGrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6920 | MG3-6-CD5-sgRNA-B4 | mG*mC*mU*rCrCrUrUrCrUrUrGrArArGrCrArUrCrUrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6921 | MG3-6-CD5-sgRNA-C4 | mA*mG*mA*rGrArCrUrGrArGrGrCrArGrGrCrArGrArGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6922 | MG3-6-CD5-sgRNA-D4 | mA*mC*mC*rArGrCrCrCrUrUrGrCrCrArArUrCrCrArArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6923 | MG3-6-CD5-sgRNA-E4 | mU*mG*mC*rCrCrUrCrCrUrUrUrGrCrUrCrArGrGrUrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6924 | MG3-6-CD5-sgRNA-F4 | mG*mG*mC*rArArGrArArCrUrCrGrGrCrCrArCrUrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6925 | MG3-6-CD5-sgRNA-G4 | mC*mC*mA*rGrGrGrArGrGrUrArCrArGrCrUrUrGrArGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr                                                         |

【0564】

10

20

30

40

50

【表 17-5】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                    | UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU                                                                                                                                                                                     |
| 6926 | MG3-6-CD5-sgRNA-H4 | mA*mG*mC*rUrUrGrArGrUrUrCrUrGrGrArUrCrUrUrCrCrArGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6927 | MG3-6-CD5-sgRNA-A5 | mC*mU*mG*rGrArUrCrUrUrCrCrArUrUrGrGrArUrUrGrGrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6928 | MG3-6-CD5-sgRNA-B5 | mG*mG*mC*rUrGrGrUrGrUrUrCrCrCrGrUrGrGrCrUrCrCrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6929 | MG3-6-CD5-sgRNA-C5 | mG*mU*mU*rCrCrCrGrUrGrGrCrUrCrCrCrUrGrGrGrUrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU     |
| 6930 | MG3-6-CD5-sgRNA-D5 | mU*mG*mC*rUrUrCrArArGrArArGrGrArGrCrCrArCrArCrUrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6931 | MG3-6-CD5-sgRNA-E5 | mA*mG*mG*rUrUrGrUrUrGrCrArGrArGrGrArArGrUrUrCrUrGrUrUr<br>rGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>UrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCr<br>GrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU |
| 6932 | MG3-6-CD5-sgRNA-F5 | mU*mG*mC*rArGrArGrGrArArGrUrUrCrUrCrArGrGrUrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU     |
| 6933 | MG3-6-CD5-sgRNA-G5 | mU*mC*mU*rCrCrArGrGrUrCrCrUrGrGrGrUrCrUrUrGrUrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6934 | MG3-6-CD5-sgRNA-H5 | mG*mC*mC*rUrCrArUrArGrCrUrGrArUrGrGrUrArCrCrCrCrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU<br>rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr<br>UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU<br>*mU*mU   |
| 6935 | MG3-6-CD5-sgRNA-A6 | mC*mA*mC*rGrCrCrGrGrCrArCrArGrUrGrCrUrGrGrCrCrGrGrUrUr<br>GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArU                                                                                                                                    |

10

20

30

40

【0565】

【表 17-6】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                           |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                    | rCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                          |
| 6936 | MG3-6-CD5-sgRNA-B6 | mA*mA*mG*rGrCrArCrCrGrUrGrGrArGrGrUrGrCrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6937 | MG3-6-CD5-sgRNA-C6 | mG*mA*mC*rGrCrUrGrGrUrGrArCrCrCrArArCrArUrCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6938 | MG3-6-CD5-sgRNA-D6 | mG*mG*mA*rCrArGrArArGrArGrCrCrCrCrGrGrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 6939 | MG3-6-CD5-sgRNA-E6 | mU*mC*mC*rUrGrGrCrUrGrArArGrArGrCrUrGrUrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6940 | MG3-6-CD5-sgRNA-F6 | mC*mC*mC*rCrArCrCrArGrArCrGrGrCrUrCrUrGrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6941 | MG3-6-CD5-sgRNA-G6 | mC*mC*mC*rArGrGrCrCrArGrGrArUrCrCrArArCrCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6942 | MG3-6-CD5-sgRNA-H6 | mU*mU*mC*rArCrUrArGrCrUrUrCrUrUrGrUrArGrGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6943 | MG3-6-CD5-sgRNA-A7 | mC*mC*mA*rGrCrArGrCrArCrCrArCrCrArGrGrArGrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6944 | MG3-6-CD5-sgRNA-B7 | mA*mU*mG*rCrUrUrGrCrCrArCrCrGrUrGrCrUrGrCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 694  | MG3-6-CD5-sgRNA-C7 | mA*mC*mC*rGrUrGrCrCrUrGrCrGrGrCrCrArGrGrCrCrUrGrGrUrUr                                                                                                                                                                       |

【0566】

10

20

30

40

50

【表 17-7】

| 配列番号 | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                          |
|------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5    |                    | GrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU                                                       |
| 6946 | MG3-6-CD5-sgRNA-D7 | mC*mC*mU*rGrCrGrGrCrCrArGrGrCrCrUrGrCrGrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6947 | MG3-6-CD5-sgRNA-E7 | mU*mC*mC*rGrCrCrArGrArArGrArArGrCrArGrCrGrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6948 | MG3-6-CD5-sgRNA-F7 | mU*mU*mA*rCrUrGrUrUrUrUrGrGrUrUrCrArUrUrCrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6949 | MG3-6-CD5-sgRNA-G7 | mU*mC*mC*rArCrUrGrGrCrGrCrUrGrCrUrUrCrUrUrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6950 | MG3-6-CD5-sgRNA-H7 | mA*mG*mC*rUrGrArCrArGrGrUrGrGrGrArGrUrUrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6951 | MG3-6-CD5-sgRNA-A8 | mG*mG*mC*rUrGrUrArUrUrCrGrUrUrArUrCrCrArCrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6952 | MG3-6-CD5-sgRNA-B8 | mU*mC*mG*rUrUrArUrCrCrArCrGrUrGrGrGrArGrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU |
| 6953 | MG3-6-CD5-sgRNA-C8 | mG*mG*mA*rGrGrCrUrGrUrGrGrGrUrUrCrUrCrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |
| 6954 | MG3-6-CD5-sgRNA-D8 | mC*mC*mU*rUrUrCrUrUrUrCrCrCrArGrCrUrCrUrGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU   |

【0567】

10

20

30

40

50

【表 17-8】

| 配列番号                                                                                                                                                                                                                                                                  | エンティティ名            | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 6955                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-6-CD5-sgRNA-E8 | mC*mC*mG*rArCrArGrUrGrArCrUrArUrGrArUrCrUrGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6956                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-6-CD5-sgRNA-F8 | mG*mA*mC*rUrArUrGrArUrCrUrGrCrArUrGrGrGrGrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 6957                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-6-CD5-sgRNA-G8 | mC*mU*mU*rUrArCrArGrCrCrUrCrUrGrArGrCrCrCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 6958                                                                                                                                                                                                                                                                  | MG3-6-CD5-sgRNA-H8 | mA*mU*mA*rGrUrCrArCrUrGrUrCrGrGrArGrGrArGrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 化学修飾に関する記載:m=2' O-メチルリボヌクレオチド(例えば,mC=2' ヒドロキシルの代わりに2' -O メチルを有するシトシンリボヌクレオチド)、f=2' -フルオロリボヌクレオチド(例えば,fC=2' ヒドロキシルの代わりに2' フッ素を有するシトシンリボヌクレオチド)、*=ホスホロチオエート結合、r:糖リボースを含む天然 RNA 結合(例えば、A 塩基のリボース又は RNA 形態は rA と記載される)、d:デオキシリボース糖(DNA)結合(例えば、A 塩基のデオキシリボース形態は dA と記載される) |                    |                                                                                                                                                                                                                                  |

【0568】

【表 18-1】

表 11B : 実施例 20 で標的とした部位

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------|-------------------|-------------------------|
| 6959 | MG3-6-CD5-標的部位-A1 | AGAAGGCCAGAAACCATGCCCCA |
| 6960 | MG3-6-CD5-標的部位-B1 | GTACAAGGTGGCCAGCGGTTGC  |
| 6961 | MG3-6-CD5-標的部位-C1 | TTCTGACCCCCAGATTTCCAGG  |
| 6962 | MG3-6-CD5-標的部位-D1 | CACCCGTTCCAACTCGAAGTGC  |
| 6963 | MG3-6-CD5-標的部位-E1 | ACTCGAAGTGCCAGGGCCAGCT  |
| 6964 | MG3-6-CD5-標的部位-F1 | GCACATGGTTTGCAGCCAGAGC  |
| 6965 | MG3-6-CD5-標的部位-G1 | GGGCCGGAGCTCCAAGCAGTGG  |

【0569】

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                     |
|------|-------------------|------------------------|
| 6966 | MG3-6-CD5-標的部位-H1 | CTCAATCATCTGCTACGGACAA |
| 6967 | MG3-6-CD5-標的部位-A2 | CAGAAATGACATGTGTCACTCT |
| 6968 | MG3-6-CD5-標的部位-B2 | GGCTGGCTAGTTACCCACCTAA |
| 6969 | MG3-6-CD5-標的部位-C2 | GCTAGTTACCCACCTAAGCAGG |
| 6970 | MG3-6-CD5-標的部位-D2 | TGAGGTGTGTAGGTGACAAGGA |
| 6971 | MG3-6-CD5-標的部位-E2 | GTGTAGGTGACAAGGAAGGGGC |
| 6972 | MG3-6-CD5-標的部位-F2 | GCACCCACAGTTCAGCCGCTG  |
| 6973 | MG3-6-CD5-標的部位-G2 | TGGCAGACTTTTGACGCTTGAC |
| 6974 | MG3-6-CD5-標的部位-H2 | CCATGTGCCATCCGTCCTTGAG |
| 6975 | MG3-6-CD5-標的部位-A3 | GGTGAGCCTTGCCTGGAAATCT |
| 6976 | MG3-6-CD5-標的部位-B3 | CAGAAGACAACACCTCCAACGA |
| 6977 | MG3-6-CD5-標的部位-C3 | CAACTCCAGAGCCCACAGGTAA |
| 6978 | MG3-6-CD5-標的部位-D3 | GGGCTCTGGAGTTGTGGTGGGC |
| 6979 | MG3-6-CD5-標的部位-E3 | TGTCGTTGGAGGTGTGTCTTC  |
| 6980 | MG3-6-CD5-標的部位-F3 | CTCTCTCCTCTCCTAGCTCCTC |
| 6981 | MG3-6-CD5-標的部位-G3 | GCCTGGGGGGTACCATCAGCTA |
| 6982 | MG3-6-CD5-標的部位-H3 | CCATCAGCTATGAGGCCCAGGA |
| 6983 | MG3-6-CD5-標的部位-A4 | CTATGAGGCCCAGGACAAGACC |
| 6984 | MG3-6-CD5-標的部位-B4 | GCTCCTTCTTGAAGCATCTGCC |
| 6985 | MG3-6-CD5-標的部位-C4 | AGAGACTGAGGCAGGCAGAGCC |
| 6986 | MG3-6-CD5-標的部位-D4 | ACCAGCCCTTGCCAATCCAATG |
| 6987 | MG3-6-CD5-標的部位-E4 | TGCCCTCCTTTGCTCAGGTAAG |
| 6988 | MG3-6-CD5-標的部位-F4 | GGCAAGAACTCGGCCACTTTTC |
| 6989 | MG3-6-CD5-標的部位-G4 | CCAGGGAGGTACAGCTTGAGTT |

【0570】

10

20

30

40

50

【表 18-3】

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------|-------------------|-------------------------|
| 6990 | MG3-6-CD5-標的部位-H4 | AGCTTGAGTTCTGGATCTTCCA  |
| 6991 | MG3-6-CD5-標的部位-A5 | CTGGATCTTCCATTGGATTGGC  |
| 6992 | MG3-6-CD5-標的部位-B5 | GGCTGGTGTTCCCGTGGCTCCC  |
| 6993 | MG3-6-CD5-標的部位-C5 | GTTCCCGTGGCTCCCCTGGGTC  |
| 6994 | MG3-6-CD5-標的部位-D5 | TGCTTCAAGAAGGAGCCACACT  |
| 6995 | MG3-6-CD5-標的部位-E5 | AGGTTGTTGCAGAGGAAGTTCT  |
| 6996 | MG3-6-CD5-標的部位-F5 | TGCAGAGGAAGTTCTCCAGGTC  |
| 6997 | MG3-6-CD5-標的部位-G5 | TCTCCAGGTCCTGGGTCTTGTC  |
| 6998 | MG3-6-CD5-標的部位-H5 | GCCTCATAGCTGATGGTACCCC  |
| 6999 | MG3-6-CD5-標的部位-A6 | CACGCCGGCACAGTGCTGGCCG  |
| 7000 | MG3-6-CD5-標的部位-B6 | AAGGCACCGTGGAGGTGCGCCA  |
| 7001 | MG3-6-CD5-標的部位-C6 | GACGCTGGTGACCCAACATCCC  |
| 7002 | MG3-6-CD5-標的部位-D6 | GGACAGAAGAGCCCCCGGGATG  |
| 7003 | MG3-6-CD5-標的部位-E6 | TCCTGGCTGAAGAGCTGTCACA  |
| 7004 | MG3-6-CD5-標的部位-F6 | CCCCACCAGACGGCTCTGCACC  |
| 7005 | MG3-6-CD5-標的部位-G6 | CCCAGGCCAGGATCCAAACCCC  |
| 7006 | MG3-6-CD5-標的部位-H6 | TTCACTAGCTTCTTGTAGGCAA  |
| 7007 | MG3-6-CD5-標的部位-A7 | CCAGCAGCACCACCAGGAGCAC  |
| 7008 | MG3-6-CD5-標的部位-B7 | ATGCTTGCCACCGTGCCTGCGG  |
| 7009 | MG3-6-CD5-標的部位-C7 | ACCGTGCCTGCGGCCAGGCCTG  |
| 7010 | MG3-6-CD5-標的部位-D7 | CCTGCGGCCAGGCCTGCGGGGT  |
| 7011 | MG3-6-CD5-標的部位-E7 | TCCGCCAGAAGAAGCAGCGCCA  |
| 7012 | MG3-6-CD5-標的部位-F7 | TTACTGTTTTGGTTTCATCCCCG |
| 7013 | MG3-6-CD5-標的部位-G7 | TCCACTGGCGCTGCTTCTTCTG  |

【0571】

10

20

30

40

50

【表 18-4】

| 配列番号 | エンティティ名           | 配列                      |
|------|-------------------|-------------------------|
| 7014 | MG3-6-CD5-標的部位-H7 | AGCTGACAGGTGGGAGTTCCTG  |
| 7015 | MG3-6-CD5-標的部位-A8 | GGCTGTATTTCGTTATCCACGTG |
| 7016 | MG3-6-CD5-標的部位-B8 | TCGTTATCCACGTGGGAGGCTG  |
| 7017 | MG3-6-CD5-標的部位-C8 | GGAGGCTGTGGGGTTCTCAGCA  |
| 7018 | MG3-6-CD5-標的部位-D8 | CCTTCTTTCCCCAGCTCTGGA   |
| 7019 | MG3-6-CD5-標的部位-E8 | CCGACAGTGACTATGATCTGCA  |
| 7020 | MG3-6-CD5-標的部位-F8 | GACTATGATCTGCATGGGGCTC  |
| 7021 | MG3-6-CD5-標的部位-G8 | CTTTACAGCCTCTGAGCCCCAT  |
| 7022 | MG3-6-CD5-標的部位-H8 | ATAGTCACTGTCGGAGGAGTTG  |

## 【0572】

## 実施例 21-MG3-6 及び MG3-8 による標的 RNA 切断

5' 隣接配列 UUGGACCA を有するスパーサー (GGUCAGGGCGCGUCA GCGGGUGUUGGCGGGUGUCGGGGCGUGGCUUAAAUUUUGGAC CAGUCGAGGCUUGCGACGUGGUGGCUUUUCCAGUCGGGA AACCU G) を含有する 101 nt の RNA を、製造業者の指示に従って、T7 Megascript キット (NEB) を使用して、T7 プロモーター含有 PCR 産物の転写を介して調製した。得られた RNA を、Monarch RNA プレップスピナラム (NEB) を使用して精製し、次いで、推奨される指示に従って、FAM-マレイミド色素を使用して 5' EndTag キット (Vector labs) で標識した。得られた RNA は、1 つの 5' 標識を有し、スパーサー内の単一の位置で切断された場合、60 nt の予想されるバンドサイズを有する。RNA 切断を試験するために、ssRNA 標的を添加する前に、2 pmol のタンパク質及び sgRNA を 15 分間プレインキュベートした。RNP 複合体を、切断緩衝液 (10 mM Tris、100 mM NaCl、及び 10 mM MgCl<sub>2</sub>) 中の標識 RNA に 10:1 の比率 (200 nM RNA: 2 μM RNP) で添加し、37℃ で 1 時間インキュベートした。反応物をプロテイナーゼ K でクエンチし、15% TBE 尿素-PAGE ゲル (Bio-rad) で分離した。ゲルは、MG3-6 及び MG3-8、並びに市販の陽性対照 Saucas9 (NEB) による部位特異的 RNA 切断を示す (図 14)。結果は、MG3-6 及び MG3-8 が、標的とした RNA 切断が可能であり、RNA 切断に関して Saucas9 と同等であることを示した。

## 【0573】

## 実施例 22-FAS の DNA レベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット (Miltenyi) を使用して、PBMC から初代 T 細胞を精製した。MG3-6 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) (配列番号 7023 ~ 7056) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して T 細胞 (200,000) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 7057 ~ 7090)。

アンブリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専有のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した（図15）。

【0574】

【表19-1】

表12：実施例22のガイドRNA及び標的とした配列

| 配列番号 | 名称                 | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7023 | MG3-6-FAS-sgRNA-A1 | mC*mU*mG*rArUrGrArGrUrGrGrUrUrUrCrCrCrUrGrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7024 | MG3-6-FAS-sgRNA-B1 | mU*mU*mA*rGrArUrGrCrUrCrArGrArGrUrGrUrGrUrGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7025 | MG3-6-FAS-sgRNA-C1 | mG*mU*mG*rUrGrCrArCrArArGrGrCrUrGrGrCrArCrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7026 | MG3-6-FAS-sgRNA-D1 | mG*mA*mG*rArCrArArGrCrCrUrArUrCrArArCrArCrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7027 | MG3-6-FAS-sgRNA-E1 | mA*mC*mC*rArCrCrArGrUrCrUrUrGrUrArGrGrUrGrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7028 | MG3-6-FAS-sgRNA-F1 | mC*mU*mU*rGrUrCrUrCrUrGrUrUrCrCrArCrCrUrUrUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG                              |

10

20

30

【0575】

40

50

【表 19 - 2】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                        | rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                       |
| 7029     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-G1 | mA*mG*mU*rArGrArCrUrGrUrUrArGrUrGrCrCrArUrGrArGr<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7030     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-H1 | mU*mU*mA*rCrArGrGrUrUrCrUrUrArCrGrUrCrUrGrUrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7031     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-A2 | mC*mA*mA*rGrUrGrArCrUrGrArCrArUrCrArArCrUrCrCrAr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7032     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-B2 | mA*mC*mU*rCrCrArArGrGrGrArUrUrGrGrArArUrUrGrArGr<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7033     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-C2 | mU*mG*mA*rGrGrArArGrArCrUrGrUrUrArCrUrArCrArGrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7034     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-D2 | mU*mA*mC*rArGrUrUrGrArGrArCrUrCrArGrArArCrUrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7035     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-E2 | mU*mU*mU*rGrUrGrUrArArCrArUrArCrCrUrGrGrArGrGrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7036     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-F2 | mU*mG*mG*rCrArGrArArUrUrGrGrCrCrArUrCrArUrGrArU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU  |
| 7037     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-G2 | mU*mU*mG*rGrGrCrArGrGrUrGrArArArGrGrArArGrCrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU    |
| 7038     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-H2 | mC*mU*mG*rCrArCrArGrUrCrArArUrGrGrGrArUrGrArA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU    |

10

20

30

40

【0576】

【表 19 - 3】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7039     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-A3 | mU*mU*mU*rUrCrUrUrCrCrArArArUrGrCrArGrArArGrArU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7040     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-B3 | mA*mU*mC*rUrUrCrUrGrCrArUrUrUrGrGrArArGrArArArA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7041     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-C3 | mU*mA*mG*rArArGrUrGrGrArArArUrArArCrUrGrCrArC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7042     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-D3 | mA*mA*mG*rArCrUrArArArArCrUrUrArCrUrUrGrGrUrGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7043     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-E3 | mG*mU*mU*rUrArCrArUrCrUrGrCrArCrUrUrGrGrUrArUrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7044     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-F3 | mA*mA*mG*rArArGrArCrArArArGrCrCrArCrCrCrArArGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7045     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-G3 | mA*mC*mA*rArArGrCrCrArCrCrCrArArGrUrUrArGrArUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7046     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-H3 | mC*mC*mC*rCrArArGrUrUrArGrArUrCrUrGrGrArUrCrCrUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7047     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-A4 | mC*mA*mG*rArArArGrCrArCrArGrArArArGrGrArArArArC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7048     | MG3-6-FAS-<br>sgRNA-B4 | mA*mA*mU*rArCrCrUrArCrArGrGrArUrUrUrArArArGrUrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7049     | MG3-6-FAS-             | mC*mA*mG*rUrGrGrCrArArUrArArArUrUrUrArUrCrUrGrG                                                                                                                                                                                                    |

【0577】

10

20

30

40

50

【表 19 - 4】

| 配列番号 | 名称                 | 配列                                                                                                                                                                                                                                     |
|------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | sgRNA-C4           | rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                    |
| 7050 | MG3-6-FAS-sgRNA-D4 | mA*mG*mU*rCrArUrGrArCrArCrUrArArGrUrCrArArGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7051 | MG3-6-FAS-sgRNA-E4 | mG*mU*mG*rUrCrArArUrGrArArGrCrCrArArArArUrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7052 | MG3-6-FAS-sgRNA-F4 | mA*mG*ma*rArGrCrGrUrArUrGrArCrArCrArUrUrGrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7053 | MG3-6-FAS-sgRNA-G4 | mU*mU*mU*rGrUrArCrUrCrUrUrGrCrArGrArGrArArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 7054 | MG3-6-FAS-sgRNA-H4 | mG*mU*mU*rUrUrUrCrArCrUrCrUrArGrArCrCrArArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7055 | MG3-6-FAS-sgRNA-A5 | mU*mG*ma*rArUrUrUrUrCrUrCrUrCrUrGrCrArArGrArGrUrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7056 | MG3-6-FAS-sgRNA-B5 | mA*mG*ma*rGrUrArCrArArArGrArUrUrGrGrCrUrUrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7057 | MG3-6-FAS-標的部位-A1  | CTGATGAGTGGTTCCCTGAGC                                                                                                                                                                                                                  |
| 7058 | MG3-6-FAS-標的部位-B1  | TTAGATGCTCAGAGTGTGTGCA                                                                                                                                                                                                                 |
| 7059 | MG3-6-FAS-標的部位-C1  | GTGTGCACAAGGCTGGCACGCC                                                                                                                                                                                                                 |
| 7060 | MG3-6-FAS-標的部位-D1  | GAGACAAGCCTATCAACACCTA                                                                                                                                                                                                                 |
| 7061 | MG3-6-FAS-標的部位-E1  | ACCACCAGTCTGTAGGTGTGTG                                                                                                                                                                                                                 |
| 7062 | MG3-6-FAS-標的部位     | CTTGCTCTGTTCACCTTTCA                                                                                                                                                                                                                   |

【0578】

10

20

30

40

50

【表 19 - 5】

| 配列<br>番号 | 名称                    | 配列                      |
|----------|-----------------------|-------------------------|
|          | 部位-F1                 |                         |
| 7063     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-G1 | AGTAGACTGTTAGTGCCATGAG  |
| 7064     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-H1 | TTACAGGTTCTTACGTCTGTTG  |
| 7065     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-A2 | CAAGTGA CTGACATCAACTCCA |
| 7066     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-B2 | ACTCCAAGGGATTGGAATTGAG  |
| 7067     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-C2 | TGAGGAAGACTGTTACTACAGT  |
| 7068     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-D2 | TACAGTTGAGACTCAGAACTTG  |
| 7069     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-E2 | TTTGTGTAACATACCTGGAGGA  |
| 7070     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-F2 | TGGCAGAATTGGCCATCATGAT  |
| 7071     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-G2 | TTGGGCAGGTGAAAGGAAAGCT  |
| 7072     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-H2 | CTGCACAGTCAATGGGGATGAA  |
| 7073     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-A3 | TTTTCTTCCAAATGCAGAAGAT  |
| 7074     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-B3 | ATCTTCTGCATTTGGAAGAAAA  |
| 7075     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-C3 | TAGAAGTGGAATAAACTGCAC   |
| 7076     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-D3 | AAGACTAAA ACTTACTTGGTGC |
| 7077     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-E3 | GTTTACATCTGCACTTGGTATT  |
| 7078     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-F3 | AAGAAGACAAAGCCACCCCAAG  |
| 7079     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-G3 | ACAAAGCCACCCCAAGTTAGAT  |
| 7080     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-H3 | CCCCAAGTTAGATCTGGATCCT  |
| 7081     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-A4 | CAGAAAGCACAGAAAGGAAAAC  |
| 7082     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-B4 | AATACCTACAGGATTTAAAGTT  |
| 7083     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-C4 | CAGTGGCAATAAATTTATCTGG  |
| 7084     | MG3-6-FAS-標的<br>部位-D4 | AGTCATGACACTAAGTCAAGTT  |

【0579】

10

20

30

40

50

【表 19-6】

| 配列番号                                                   | 名称                    | 配列                     |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 7085                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-E4 | GTGTCAATGAAGCCAAAATAGA |
| 7086                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-F4 | AGAAGCGTATGACACATTGATT |
| 7087                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-G4 | TTTGTACTCTTGCAGAGAAAAT |
| 7088                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-H4 | GTTTTTCACTCTAGACCAAGCT |
| 7089                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-A5 | TGAATTTTCTCTGCAAGAGTAC |
| 7090                                                   | MG3-6-FAS-標的<br>部位-B5 | AGAGTACAAAGATTGGCTTTTT |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合 |                       |                        |

10

## 【0580】

実施例 23-PD-1 の DNA レベルでの遺伝子編集結果

20

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット (Miltenyi) を使用して、P BMC から初代 T 細胞を精製した。MG3-6 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) (配列番号 7091 ~ 7128) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して T 細胞 (200, 000) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 7129 ~ 7166)。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 16)。

## 【0581】

30

【表 20-1】

表 13 : 実施例 23 のガイド RNA 及び標的とした配列

| 配列番号 | 名称                      | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7091 | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-A1 | mG*mG*mU*rGrGrCrCrArArGrGrArArGrCrCrGrGrUrCrArGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7092 | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-B1 | mG*mG*mG*rCrCrArArGrArGrCrArGrUrGrUrCrCrArUrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

40

## 【0582】

50

【表 20 - 2】

| 配列<br>番号 | 名称                      | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7093     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-C1 | mG*mG*mC*rCrCrUrCrGrGrArGrUrGrCrCrArGrCrCrArCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7094     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-D1 | mG*mG*mC*rCrUrCrArGrUrGrGrCrUrGrGrGrCrArCrUrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7095     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-E1 | mG*mG*mG*rCrArCrCrUrCrArUrCrCrCrCrCrCrCrCrGrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7096     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-F1 | mC*mU*mG*rCrUrCrArGrGrGrArCrArCrArGrGrCrArCrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7097     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-G1 | mG*mG*mA*rCrArCrArGrGrGrCrArCrGrGrGrGrGrCrUrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7098     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-H1 | mA*mG*mC*rUrGrGrArUrUrUrCrCrArGrUrGrGrCrGrArGrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7099     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-A2 | mG*mU*mU*rCrUrCrUrGrUrGrGrArCrUrArUrGrGrGrArG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7100     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-B2 | mC*mU*mC*rArGrCrCrGrUrGrCrCrUrGrUrGrUrUrCrUrCrUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7101     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-C2 | mA*mC*mA*rGrArGrArArCrArCrArGrGrCrArCrGrCrUrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7102     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-D2 | mG*mG*mG*rUrCrCrUrGrGrCrCrGrUrCrArUrCrUrGrCrUrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7103     | MG3-6-PD-1-             | mC*mG*mG*rCrCrCrGrGrGrArGrCrArGrArUrGrArCrGrGrCr                                                                                                                                                                                                 |

【0583】

10

20

30

40

50



【表 20 - 4】

| 配列<br>番号 | 名称                      | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                         | rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                          |
| 7114     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-H3 | mC*mC*mA*rUrCrUrCrCrUrGrGrCrCrCrCrArArGrGrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 7115     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-A4 | mA*mU*mG*rArCrArGrCrGrGrCrArCrCrUrArCrCrUrUrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7116     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-B4 | mG*mG*mU*rArGrGrUrGrCrCrGrCrUrGrUrCrArUrUrGrCrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7117     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-C4 | mG*mU*mG*rArCrUrUrCrCrArCrArUrGrArGrCrGrUrGrGrUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7118     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-D4 | mG*mA*mC*rArCrGrGrArArGrCrGrGrCrArGrUrCrCrUrGrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7119     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-E4 | mC*mG*mA*rGrGrArCrCrGrCrArGrCrCrArGrCrCrGrGrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7120     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-F4 | mG*mG*mA*rCrArArGrCrUrGrGrCrCrGrCrCrUrUrCrCrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7121     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-G4 | mG*mC*mC*rArGrCrUrUrGrUrCrCrGrUrCrUrGrGrUrUrGrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7122     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-H4 | mU*mG*mU*rCrCrCrCrUrUrCrGrGrUrCrArCrCrArCrGrArGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7123     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-A5 | mA*mG*mC*rArGrGrGrCrUrGrGrGrGrArGrArArGrGrUrGrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr                                                                                         |

【0585】

10

20

30

40

50

【表 20 - 5】

| 配列<br>番号 | 名称                      | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                         | UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                 |
| 7124     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-B5 | mU*mG*mG*rGrGrArGrArArGrGrUrGrGrGrGrGrUrUrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 7125     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-C5 | mC*mU*mC*rCrArUrCrUrCrUrCrArGrArCrUrCrCrCrArGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7126     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-D5 | mG*mC*mC*rArGrGrArUrGrGrUrUrCrUrUrArGrGrUrArGrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7127     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-E5 | mA*mG*mU*rCrGrUrCrUrGrGrGrCrGrGrUrGrCrUrArCrArAr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7128     | MG3-6-PD-1-<br>sgRNA-F5 | mA*mG*mA*rCrGrArCrUrGrGrCrCrArGrGrGrCrGrCrUrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7129     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-A1  | GGTGGCCAAGGAAGCCGGTCAG                                                                                                                                                                                                                             |
| 7130     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-B1  | GGGCCAAGAGCAGTGTCCATCC                                                                                                                                                                                                                             |
| 7131     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-C1  | GGCCCTCGGAGTGGCCAGCCAC                                                                                                                                                                                                                             |
| 7132     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-D1  | GGCCTCAGTGGCTGGGCACTCC                                                                                                                                                                                                                             |
| 7133     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-E1  | GGGCACCTCATCCCCGCCCGC                                                                                                                                                                                                                              |
| 7134     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-F1  | GGACACAGGGCACGGGGGGCTC                                                                                                                                                                                                                             |
| 7135     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-G1  | GGACACAGGGCACGGGGGGCTC                                                                                                                                                                                                                             |
| 7136     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-H1  | AGCTGGATTTCAGTGGCGAGA                                                                                                                                                                                                                              |
| 7137     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-A2  | GTTCTCTGTGGACTATGGGGAG                                                                                                                                                                                                                             |
| 7138     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-B2  | CTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCT                                                                                                                                                                                                                             |
| 7139     | MG3-6-PD-1-標的           | ACAGAGAACACAGGCACGGCTG                                                                                                                                                                                                                             |

【0586】

10

20

30

40

50

【表 20 - 6】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                      |
|----------|------------------------|-------------------------|
|          | 部位-C2                  |                         |
| 7140     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-D2 | GGGTCCTGGCCGTCATCTGCTC  |
| 7141     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-E2 | CGGCCCCGGGAGCAGATGACGGC |
| 7142     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-F2 | GGGAGCAGATGACGGCCAGGAC  |
| 7143     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-G2 | TGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGT  |
| 7144     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-H2 | GCCAGGACCCAGACTAGCAGCA  |
| 7145     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-A3 | ACTAGCAGCACCAGGCTGCCCA  |
| 7146     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-B3 | GGCCGCCCACGACACCAACCAC  |
| 7147     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-C3 | AACTGGCCGGCTGGCCTGGGTG  |
| 7148     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-D3 | ACAGCCCACCCCAGCCCCTCAC  |
| 7149     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-E3 | CTGGCCTGGGTGAGGGGCTGGG  |
| 7150     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-F3 | CCTGTCACCCTGAGCTCTGCCC  |
| 7151     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-G3 | GGCTCTCTTTGATCTGCGCCTT  |
| 7152     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-H3 | CCATCTCCCTGGCCCCCAAGGC  |
| 7153     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-A4 | ATGACAGCGGCACCTACCTCTG  |
| 7154     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-B4 | GGTAGGTGCCGCTGTCATTGCG  |
| 7155     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-C4 | GTGACTCCACATGAGCGTGGT   |
| 7156     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-D4 | GACACGGAAGCGGCAGTCCTGG  |
| 7157     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-E4 | CGAGGACCGCAGCCAGCCCCGC  |
| 7158     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-F4 | GGACAAGCTGGCCGCCTTCCCC  |
| 7159     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-G4 | GCCAGCTTGTCCTGCTGGTTGC  |
| 7160     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-H4 | TGTCCCCTTCGGTCACCACGAG  |
| 7161     | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-A5 | AGCAGGGCTGGGGAGAAGGTGG  |

【0587】

10

20

30

40

50

【表 20-7】

| 配列番号                                                   | 名称                     | 配列                     |
|--------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 7162                                                   | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-B5 | TGGGGAGAAGGTGGGGGGGTTC |
| 7163                                                   | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-C5 | CTCCATCTCTCAGACTCCCCAG |
| 7164                                                   | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-D5 | GCCAGGATGGTTCTTAGGTAGG |
| 7165                                                   | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-E5 | AGTCGTCTGGGCGGTGCTACAA |
| 7166                                                   | MG3-6-PD-1-標的<br>部位-F5 | AGACGACTGGCCAGGGCGCCTG |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合 |                        |                        |

10

## 【0588】

実施例 24-hRosa26 の DNA レベルでの遺伝子編集結果

製造業者の推奨に従って、ネガティブ選択キット (Miltenyi) を使用して、PBMC から初代 T 細胞を精製した。MG3-6 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) (配列番号 7167 ~ 7198) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して T 細胞 (200,000) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 7199 ~ 7230)。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 17)。

20

## 【0589】

【表 21-1】

表 14: 実施例 24 のガイド RNA 及び標的とした配列

30

| 配列番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7167 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-A1 | mA*mU*mC*rUrGrUrCrUrGrGrUrUrUrCrGrCrGrArGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7168 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-B1 | mU*mU*mU*rCrGrCrGrArGrArCrArCrCrArGrGrCrUrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7169 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-C1 | mA*mG*mC*rArArGrUrArCrArArArArUrGrGrArArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr                                                                                     |

40

## 【0590】

50

【表 2 1 - 2】

| 配列<br>番号 | 名称                         | 配列                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                            | UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                               |
| 7170     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-D1 | mG*mC*mA*rArArArGrCrUrArArArUrUrUrUrCrUrArU<br>rGrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU         |
| 7171     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-E1 | mU*mG*mC*rUrArCrArCrUrUrUrGrGrUrGrGrUrGrCrArGrCr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7172     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-F1 | mA*mC*mU*rCrCrCrCrUrGrCrArGrGrGrCrArArCrGrCrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7173     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-G1 | mC*mG*mA*rCrUrCrGrArCrArUrGrGrArGrGrCrGrArUrGrAr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7174     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-H1 | mA*mU*mC*rArCrGrCrGrArGrGrArGrGrArArArGrGrArGrG<br>rGrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7175     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-A2 | mA*mG*mG*rArArArGrGrArGrGrGrArGrGrCrUrUrCrUrU<br>rGrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7176     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-B2 | mA*mC*mC*rUrCrCrUrCrCrArCrCrGrCrArGrCrUrCrCrCrUr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7177     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-C2 | mG*mC*mG*rCrCrUrCrCrArCrCrCrArCrArArArCrCrArGr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7178     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-D2 | mC*mC*mC*rArCrCrCrCrArCrGrArGrUrGrCrCrUrGrUrAr<br>GrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7179     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-E2 | mC*mU*mC*rGrUrGrGrGrGrUrGrGrGrGrGrArGrGrArGrC<br>rGrUrUrGrArGrArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr                                     |

10

20

30

40

【0591】

【表 2 1 - 3】

| 配列<br>番号 | 名称                         | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                            | GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                     |
| 7180     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-F2 | mG*mC*mU*rGrCrGrGrUrGrGrArGrGrArGrGrUrGrGrArGrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7181     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-G2 | mU*mC*mU*rCrUrGrCrUrGrCrCrUrCrCrCrGrUrCrUrUrGrUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7182     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-H2 | mC*mU*mC*rCrCrGrUrCrUrUrGrUrArArGrGrArCrCrGrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7183     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-A3 | mC*mG*mA*rGrUrCrGrCrUrUrCrUrCrGrArUrUrArUrGrGrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7184     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-B3 | mA*mU*mU*rArUrGrGrGrCrGrGrGrArUrUrCrUrUrUrUrGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7185     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-C3 | mG*mG*mG*rArUrUrCrUrUrUrUrGrCrCrUrArGrGrCrUrUrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCr<br>UrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCr<br>GrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7186     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-D3 | mC*mC*mU*rGrCrArGrGrGrGrArGrUrGrArGrCrArGrCrUrGr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7187     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-E3 | mA*mC*mU*rCrCrGrArUrUrArGrUrUrUrArUrCrUrUrCrCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7188     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-F3 | mU*mC*mC*rCrArCrGrGrArCrUrArGrArGrUrUrGrGrUrGrUr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7189     | MG3-6-hRosa26-<br>sgRNA-G3 | mA*mA*mA*rUrGrGrArGrCrUrUrArGrUrCrArUrUrCrArCrCr<br>GrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrA<br>rArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrU<br>rCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrG<br>rGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

20

30

40

【0592】

【表 2 1 - 4】

| 配列番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7190 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-H3 | mA*mC*mC*rUrGrGrGrGrCrUrGrArUrUrUrArUrGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7191 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-A4 | mG*mC*mU*rGrArUrUrUrArUrGrCrArArCrGrArGrArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7192 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-B4 | mA*mU*mC*rArCrCrUrGrArGrUrUrUrArUrArCrCrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7193 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-C4 | mG*mC*mU*rGrCrArCrCrArCrCrArArArGrUrGrUrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7194 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-D4 | mU*mU*mC*rCrCrUrCrCrCrUrCrArCrCrCrUrCrUrCrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7195 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-E4 | mG*mC*mC*rUrGrGrUrGrUrCrUrCrGrCrGrArArArCrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7196 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-F4 | mA*mC*mA*rGrArUrUrGrGrUrUrCrCrArCrCrArCrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 7197 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-G4 | mC*mA*mC*rCrArCrArArArUrUrArArGrGrCrUrUrGrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7198 | MG3-6-hRosa26-sgRNA-H4 | mC*mA*mU*rUrUrUrArUrCrCrUrUrUrUrUrCrCrUrUrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 7199 | MG3-6-hRosa26-標的部位-A1  | ATCTGTCTGGTTTCGCGAGACA                                                                                                                                                                                                             |
| 7200 | MG3-6-hRosa26-標的部位-B1  | TTTCGCGAGACACCAGGCTACC                                                                                                                                                                                                             |
| 7201 | MG3-6-hRosa26-標        | AGCAAGTACAACAAATGGAAAA                                                                                                                                                                                                             |

【0593】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 5】

| 配列<br>番号 | 名称                        | 配列                       |
|----------|---------------------------|--------------------------|
|          | 的部位-C1                    |                          |
| 7202     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-D1 | GCAAAAGCTAAATTTTCTAT     |
| 7203     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-E1 | TGCTACACTTTGGTGGTGCAGC   |
| 7204     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-F1 | ACTCCCCTGCAGGGCAACGCCC   |
| 7205     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-G1 | CGACTCGACATGGAGGCGATGA   |
| 7206     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-H1 | ATCACGCGAGGAGGAAAGGAGG   |
| 7207     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-A2 | AGGAAAGGAGGGAGGGCTTCTT   |
| 7208     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-B2 | ACCTCCTCCACCGCAGCTCCCT   |
| 7209     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-C2 | GCGCCTCCCACCCACAAACCAG   |
| 7210     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-D2 | CCCACCCCCACGAGTGCCTGTA   |
| 7211     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-E2 | CTCGTGGGGGTGGGGAGGAGC    |
| 7212     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-F2 | GCTGCGGTGGAGGAGGTGGAGA   |
| 7213     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-G2 | TCTCTGCTGCCTCCCGTCTTGT   |
| 7214     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-H2 | CTCCCGTCTTGTAAGGACCGCC   |
| 7215     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-A3 | CGAGTCGCTTCTCGATTATGGG   |
| 7216     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-B3 | ATTATGGGCGGGATTCTTTTGC   |
| 7217     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-C3 | GGGATTCTTTTGCCTAGGCTTA   |
| 7218     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-D3 | CCTGCAGGGGAGTGAGCAGCTG   |
| 7219     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-E3 | ACTCCGATTAGTTTATCTTCCC   |
| 7220     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-F3 | TCCCACGGACTIONAGATTGGTGT |
| 7221     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-G3 | AAATGGAGCTTAGTCATTACCC   |
| 7222     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-H3 | ACCTGGGGCTGATTTTATGCAA   |
| 7223     | MG3-6-hRosa26-標<br>的部位-A4 | GCTGATTTTATGCAACGAGACT   |

【 0 5 9 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 6】

| 配列番号                                                   | 名称                    | 配列                     |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 7224                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-B4 | ATCACCTGAGTTTTATACCATT |
| 7225                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-C4 | GCTGCACCACCAAAGTGTAGCA |
| 7226                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-D4 | TTCCCTCCCTCACCTCTCTCC  |
| 7227                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-E4 | GCCTGGTGTCTCGCGAAACCAG |
| 7228                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-F4 | ACAGATTGGTTCCACCACAAAT |
| 7229                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-G4 | CACCACAAATTAAGGCTTGAGC |
| 7230                                                   | MG3-6-hRosa26-標的部位-H4 | CATTTTATCCTTTTTCCTTAGC |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合 |                       |                        |

10

20

## 【0595】

実施例 2 5 - K 5 6 2 細胞における T R A C 及び A A V S 1 の D N A レベルでの遺伝子編集結果

M G 2 1 - 1、M G 2 3 - 1、M G 7 3 - 1、M G 8 9 - 2、及び M G 7 1 - 2 m R N A のヌクレオフェクションを、マッピングするガイド R N A ( 5 0 0 n g の m R N A / 1 5 0 p m o l のガイド) とともに、L o n z a 4 D エレクトロポレーターを使用して K 5 6 2 細胞 ( 2 0 0 , 0 0 0 ) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム D N A を調製した。N G S ベースの D N A シーケンシングでの使用に適した P C R プライマーを作製し、最適化し、各ガイド R N A の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを I l l u m i n a M i S e q マシンでシーケンシングし、専

30

## 【0596】

【表 2 2 - 1】

表 1 5 : T R A C を標的とする場合の実施例 2 5 のガイド R N A 及び標的とした配列

| 配列番号 | 名称                   | 配列                                                                                                                                                                                                                                             |
|------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7231 | MG21-1-TRAC-sgRNA-H9 | mC*mA*mC*rCrUrUrCrUrUrCrCrCrCrArGrCrCrCrArGrGrUrGrUrUrGrUrArGrUrUrCrCrCrCrUrUrUrUrGrArArArArArArArGrUrGrUrGrUrUrArCrUrGrCrArArUrArArGrGrUrArArArCrArCrCrArCrGrArArGrCrUrCrUrGrCrCrCrUrArArCrUrGrCrCrUrUrArGrCrArGrUrUrArGrGrGrCrArUrC*mU*mU*mU |
| 7232 | MG21-1-TRAC-sgRNA-B7 | mC*mA*mA*rGrArGrCrArArCrArGrUrGrCrUrGrUrGrGrCrCrGrUrUrGrUrArGrUrUrCrCrCrCrUrUrUrUrGrArArArArArArArGrUrGrUrGrUrUrArCrUrGrCrArArUrArArGrGrUrArArArAr                                                                                             |

40

## 【0597】

50

【表 2 2 - 2】

| 配列<br>番号 | 名称                        | 配列                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                           | CrArCrCrArCrGrArArGrCrUrCrUrGrCrCrUrArArCrUrGrCr<br>CrUrUrArGrCrArGrUrUrArGrGrGrCrArUc*mU*mU*mU                                                                                                                                                             |
| 7233     | MG21-1-TRAC-<br>sgRNA-D6  | mA*mG*mA*rCrArUrGrArGrUrCrUrArUrGrGrArCrUrUrC<br>rGrUrUrGrUrArGrUrUrCrCrCrCrUrUrUrGrArArArArArA<br>rGrUrGrUrGrUrUrArCrUrGrCrArArUrArArGrGrUrArArArA<br>rCrArCrCrArCrGrArArGrCrUrCrUrGrCrCrUrArArCrUrGrCr<br>CrUrUrArGrCrArGrUrUrArGrGrGrCrArUc*mU*mU*mU     |
| 7234     | MG21-1-TRAC-<br>sgRNA-C10 | mC*mC*mA*rArArGrCrUrGrCrCrCrUrUrArCrCrUrGrGrGrCr<br>GrUrUrGrUrArGrUrUrCrCrCrCrUrUrUrGrArArArArArA<br>rGrUrGrUrGrUrUrArCrUrGrCrArArUrArArGrGrUrArArArA<br>rCrArCrCrArCrGrArArGrCrUrCrUrGrCrCrCrUrArArCrUrGrCr<br>CrUrUrArGrCrArGrUrUrArGrGrGrCrArUc*mU*mU*mU |
| 7235     | MG21-1-TRAC-標<br>的部位-H9   | CACCTTCTTCCCCAGCCCAGGT                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7236     | MG21-1-TRAC-標<br>的部位-B7   | CAAGAGCAACAGTGCTGTGGCC                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7237     | MG21-1-TRAC-標<br>的部位-D6   | AGACATGAGGTCTATGGACTTC                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7238     | MG21-1-TRAC-標<br>的部位-C10  | CCAAAGCTGCCCTTACCTGGGC                                                                                                                                                                                                                                      |
| 7239     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-E1  | mC*mC*mG*rUrGrUrArCrCrArGrCrUrGrArGrArGrArCrUrCr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU    |
| 7240     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-H8  | mU*mU*mG*rGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCrCrUrCrCrUr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU    |
| 7241     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-A3  | mA*mC*mA*rGrUrGrCrUrGrUrGrGrCrCrUrGrGrArGrCrArAr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU    |
| 7242     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-C10 | mU*mG*mA*rArArGrUrUrUrArGrGrUrUrCrGrUrArUrCrUrG<br>rGrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUr<br>GrCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrU<br>rUrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrAr<br>ArArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU    |
| 7243     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-H7  | mG*mC*mU*rUrGrArCrArUrCrArCrArGrGrArArCrUrUrUrCr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU    |
| 7244     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-B10 | mA*mA*mC*rCrCrArArUrCrArCrUrGrArCrArGrGrUrUrUr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU      |

10

20

30

40

【 0 5 9 8 】

【表 2 2 - 3】

| 配列<br>番号 | 名称                       | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7245     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-H6 | mC*mC*mU*rGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUrGrGrUrCrGrAr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrUrCrU*mU*mU*mU                   |
| 7246     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-E7 | mU*mA*mG*rArCrCrCrUrGrUrCrUrUrArCrCrUrGrUrUrUr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrUrCrU*mU*mU*mU                     |
| 7247     | MG23-1-TRAC-<br>sgRNA-C9 | mA*mG*mC*rCrGrCrArGrCrGrUrCrArUrGrArGrCrArGrArUr<br>GrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrG<br>rCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUr<br>UrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArA<br>rArGrArCrCrGrCrGrArGrUrCrU*mU*mU*mU                 |
| 7248     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-E1  | CCGTGTACCAGCTGAGAGACTC                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7249     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-H8  | TTGGGTTCCGAATCCTCCTCCT                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7250     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-A3  | ACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAA                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7251     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-C10 | TGAAAGTTTAGGTTTCGTATCTG                                                                                                                                                                                                                                                |
| 7252     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-H7  | GCTTGACATCACAGGAACCTTC                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7253     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-B10 | AACCCAATCACTGACAGGTTTT                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7254     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-H6  | CCTGTGATGTCAAGCTGGTCGA                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7255     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-E7  | TAGACCCCTGTCTTACCTGTTT                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7256     | MG23-1-TRAC-標<br>的部位-C9  | AGCCGCAGCGTCATGAGCAGAT                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7269     | MG73-1-TRAC-<br>sgRNA-G3 | mU*mC*mU*rUrGrGrUrUrUrUrArCrArGrArUrArCrGrArArC<br>rCrUrGrUrUrArUrArGrUrGrGrGrArArArUrCrArCrUrArUrAr<br>ArUrArArGrUrGrArArArUrCrGrCrArArGrGrCrUrCrUrGrUrU<br>rCrUrUrGrArArCrArUrCrCrUrUrUrArUrUrArUrArArArCrU<br>rCrCrUrGrCrCrArArUrCrGrGrUrUrGrGrGrArGrU*mU*mU*m<br>U |
| 7270     | MG73-1-TRAC-標<br>的部位-G3  | TCTTGTTTACAGATACGAACCT                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7271     | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-F1 | mA*mU*mA*rUrCrCrArGrArArCrCrUrGrArCrCrCrUrGrCr<br>CrGrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU                         |
| 7272     | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-G5 | mG*mG*mC*rCrArCrUrUrUrCrArGrGrArGrGrArGrGrArUrU<br>rCrGrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUr                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

【 0 5 9 9 】

50

【表 2 2 - 4】

| 配列<br>番号                                                   | 名称                       | 配列                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                            |                          | UrCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrCr<br>rGrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrGrCrCrUrCrArC<br>rUrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU                                                                                                              |
| 7273                                                       | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-E5 | mC*mG*mC*rArGrCrGrUrCrArUrGrArGrCrArGrArUrUrArAr<br>ArCrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU |
| 7274                                                       | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-F5 | mC*mG*mG*rCrCrArCrUrUrUrCrArGrGrArGrGrArGrGrArUr<br>UrCrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU |
| 7275                                                       | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-G1 | mG*mC*mC*rGrUrGrUrArCrCrArGrCrUrGrArGrArGrArCrUr<br>CrUrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU |
| 7276                                                       | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-E1 | mC*mC*mC*rArCrArGrArUrArUrCrCrArGrArArCrCrUrGr<br>ArCrGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU   |
| 7277                                                       | MG89-2-TRAC-<br>sgRNA-B1 | mA*mU*mC*rCrUrCrUrUrGrUrCrCrArCrArGrArUrArUrCr<br>CrArGrUrUrGrUrArGrCrUrUrCrCrUrUrGrArArGrArArArUrU<br>rCrArArCrGrUrUrGrUrUrArCrArArUrArArGrGrUrUrUrUrCr<br>GrArArArGrArUrUrArCrCrGrArArCrCrCrGrCrCrCrUrCrArCr<br>UrUrArGrGrUrGrArGrGrGrCrU*mU*mU*mU   |
| 7278                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-F1  | ATATCCAGAACCCTGACCCTGCCG                                                                                                                                                                                                                               |
| 7279                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-G5  | GGCCACTTTCAGGAGGAGGATTCG                                                                                                                                                                                                                               |
| 7280                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-E5  | CGCAGCGTCATGAGCAGATTAAAC                                                                                                                                                                                                                               |
| 7281                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-F5  | CGGCCACTTTCAGGAGGAGGATTC                                                                                                                                                                                                                               |
| 7282                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-G1  | GCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT                                                                                                                                                                                                                               |
| 7283                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-E1  | CCCACAGATATCCAGAACCCTGAC                                                                                                                                                                                                                               |
| 7284                                                       | MG89-2-TRAC-標<br>的部位-B1  | ATCCTCTTGTCACAGATATCCA                                                                                                                                                                                                                                 |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロ<br>チオエート結合 |                          |                                                                                                                                                                                                                                                        |

【 0 6 0 0 】

10

20

30

40

50

## 【表 2 3】

表 1 6 : A A V S 1 を標的とする場合の実施例 2 5 をガイド RNA 及び標的とした配列

| 配列番号                                                   | 名称                    | 配列                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7257                                                   | MG23-1-AAVS1-sgRNA-B1 | mG*mC*mU*rArCrUrGrGrCrCrUrUrArUrCrUrCrArCrArGrGrGrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrGrCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUrUrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArArArGrArCrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU                         |
| 7258                                                   | MG23-1-AAVS1-sgRNA-C1 | mC*mU*mA*rCrUrGrGrCrCrUrUrArUrCrUrCrArCrArGrGrUrGrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrGrCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrUrGrUrUrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArArArGrArCrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU                           |
| 7259                                                   | MG23-1-AAVS1-sgRNA-G1 | mA*mC*mU*rGrArCrGrCrArCrGrGrArGrGrArArArUrArGrUrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrGrCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArArArGrArCrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU                                                       |
| 7260                                                   | MG23-1-AAVS1-sgRNA-B2 | mG*mG*mA*rArCrArArUrArUrArArArUrUrGrGrGrGrArCrUrGrUrUrGrArGrArArCrCrUrGrArArArArGrGrUrGrArGrUrGrCrArArArUrArArGrGrUrUrUrArArCrCrGrArArArUrGrUrUrUrArCrCrUrGrCrArUrUrGrUrGrCrArGrUrArUrArArGrArArArGrArCrCrGrArGrGrUrCrU*mU*mU*mU                             |
| 7261                                                   | MG23-1-AAVS1-標的的部位-B1 | GCTACTGGCCTTATCTCACAGG                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7262                                                   | MG23-1-AAVS1-標的的部位-C1 | CTACTGGCCTTATCTCACAGGT                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7263                                                   | MG23-1-AAVS1-標的的部位-G1 | ACTGACGCACGGAGGAACAATA                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7264                                                   | MG23-1-AAVS1-標的的部位-B2 | GGAACAATATAAATTGGGGACT                                                                                                                                                                                                                                       |
| 7265                                                   | MG71-2-AAVS1-sgRNA-C3 | mG*mG*mA*rGrArGrGrGrUrArGrCrGrCrArGrGrGrUrGrGrUrUrUrGrArGrArGrUrGrArGrArArArUrCrArCrGrArGrUrUrCrArArArArArCrArUrGrArUrUrUrArUrCrArArArCrGrUrCrUrUrCrUrUrCrGrGrArArGrGrCrCrCrArCrArGrUrGrUrGrUrGrGrArCrArGrUrArArArGrCrUrUrGrCrUrUrCrGrGrCrArArGrCrU*mU*mU*mU |
| 7266                                                   | MG71-2-AAVS1-sgRNA-E2 | mG*mC*mC*rCrUrGrCrCrArGrGrArCrGrGrGrCrUrGrGrUrUrUrGrArGrArGrUrGrArGrArArUrCrArCrGrArGrUrUrCrArArArArCrArUrGrArUrUrUrArUrUrCrArArArCrCrGrUrCrUrUrCrUrUrCrGrGrArArGrGrCrCrCrArCrArGrUrGrUrGrGrArCrArGrUrArArArGrCrUrUrGrCrUrUrCrGrGrCrArArGrCrU*mU*mU*mU       |
| 7267                                                   | MG71-2-AAVS1-標的的部位-C3 | GGAGAGGGTAGCGCAGGGTG                                                                                                                                                                                                                                         |
| 7268                                                   | MG71-2-AAVS1-標的的部位-E2 | GCCCTGCCAGGACGGGGCTG                                                                                                                                                                                                                                         |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2'-フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合 |                       |                                                                                                                                                                                                                                                              |

## 【0601】

実施例 2 6 - H e p 3 B 細胞の s m R N A トランスフェクションを使用したヒト H A O - 1 遺伝子の M G 3 - 6 ヌクレアーゼガイドスクリーニング

ヒト H A O - 1 遺伝子（グリコール酸オキシダーゼをコードする）のエクソン 1 ~ 4 を標的化する M G 3 - 6 ヌクレアーゼのガイド RNA を、P A M 配列 5' N N R G R Y Y 3' を検索することによってインシリコで特定した。ヒトゲノム中の最も少ない予測されるオフターゲット部位を有する合計 2 1 個のガイドを、A l t R 1 / A l t R 2 末端修飾（I D T）を有する単一ガイド RNA として化学的に合成した。s g R N A の全配列は配列番号 1 1 3 5 2 ~ 1 1 3 7 2 である。

【 0 6 0 2 】

【 表 2 4 - 1 】

表 1 7 : 実施例 2 6 で使用されるガイド配列

| 配<br>列<br>番<br>号 | エンティテ<br>イ名 | 配列                                                                                                                    |
|------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 113<br>52        | hH36-1      | AAUUAGCCGGGGGAGCAUUUUCGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>53        | hH36-2      | CCCAGACCUGUAAUAGUCAUAUGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>54        | hH36-3      | CCAAAGUCUAUAUAUGACUAUUGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>55        | hH36-4      | CAAAGUUUCUUCAUCAUUUGCCGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>56        | hH36-5      | GAUGCUCGGAAGUUGCUGAAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU   |
| 113<br>57        | hH36-6      | CUCUGUCCUAAAACAGAAGUCGGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>58        | hH36-7      | UGUCGACUUCUGUUUUAGGACAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>59        | hH36-8      | GGGUCAGCAUGCCAAUAUGUGUGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>60        | hH36-9      | UCAUGCCCUGUCCCAGGGACUGGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>61        | hH36-10     | ACUCAACAUGCCCCGUUCCCGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU   |
| 113              | hH36-11     | GAACGGGCAUGAUGUUGAGUUCGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG                                                                      |

【 0 6 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

| 配列番号      | エンティティ名 | 配列                                                                                                                    |
|-----------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 62        |         | GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU                                                      |
| 113<br>63 | hH36-12 | AGUUGCAGCCAACGAAGUGCCUGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>64 | hH36-13 | UUGGCUGCAACUGUAUAUCUACGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>65 | hH36-14 | GCUAGUGCGGCAGGCAGAGAAGGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>66 | hH36-15 | GGCAGGCAGAGAAGAUGGGCUAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>67 | hH36-16 | AACCGUCUGGAUGAUGUGCGUAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>68 | hH36-17 | GAGGAAAUUUUUGGAGACGACAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>69 | hH36-18 | UGCUGCAUAUGUGGCUAAAGCAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>70 | hH36-19 | UUGAUAUCUCCCCAGCUGAUAGGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU  |
| 113<br>71 | hH36-20 | UGGGAAGAUAUCAAUUGGCUGAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |
| 113<br>72 | hH36-21 | AAUUGUUGCAAAGGGCAUUUUGGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUAAUAAG<br>GGCAUCCUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGG<br>GCGGUAUGUUUU |

10

20

30

## 【0604】

## Hep3Bトランスフェクションプロトコル

MG3-6をコードするmRNAは、MG3-6のコード配列がクローニングされたプラスミドのT7ポリメラーゼインビトロ転写によって生成された。MG3-6コード配列は、ヒトコドン使用頻度表を使用してコドン最適化され、（N末端で）SV40に由来する、及び（C末端で）ヌクレオプラスミンに由来する核局在化シグナルに隣接していた。更に、翻訳を改善するために、5'非翻訳領域（5'UTR）をコード配列の5'末端に含めた。インビボでのmRNA安定性を改善するために、3'UTR、それに続くおよそ90～110ヌクレオチドのポリAトラクトを、コード配列の3'末端でmRNA（プラスミドにおいてコードされる）に含めた。polyAテールを有さないMG3-6 mRNAをコードするDNA配列を、配列番号22に示す。インビトロ転写反応は、CleanCap（登録商標）キャッピング試薬（Trilink BioTechnologies）を含み、得られたRNAをMEGAClear（商標）Transcription Clean-Upキット（Invitrogen）を使用して精製し、TapeStation（Agilent）を使用して純度を評価し、>90%の全長RNAから構成されることが見出された。

40

## 【0605】

300ngのMG3-6 mRNA及び120ngの各単一ガイドRNA（sgRNA）を、以下のようにHep3B細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの1

50

日前に、Pen／Stepを含まないEMEM－10％ FBS－2mM グルタミン－1％NEAA培地中で10日未満培養したHep3B細胞を、TC処理した24ウェルプレートに播種した。細胞を計数し、60,000個の生細胞と同等の体積を各ウェルに加えた。更に予め平衡化した培地を各ウェルに加えて、総体積を500μLにした。トランスフェクション当日、25μLのOptiMEM培地と1.25μLのLipofectamine Messenger Max Solution (Thermo Fisher)をマスターミックス溶液中で混合し、ボルテックスし、室温で少なくとも5分間置いた。別個のチューブにおいて、300ngのMG3-6／3-4 mRNA及び120ngのsgRNAを、25μLのOptiMEM培地と混合し、軽くボルテックスした。適切な量のMessenger Max溶液を各RNA溶液に添加し、チューブをはじくようにして混合し、低速で短時間スピンドウンした。完全な編集試薬溶液を、室温で10分間インキュベートし、次いで、Hep3B細胞に直接加えた。トランスフェクションの2日後、培地をHep3B細胞の各ウェルから吸引し、MagMAX (商標) DNAマルチサンプルウルトラ2.0キットを用いたKingFisher Flexロボットにおける自動磁気ビーズ精製により、ゲノムDNAを精製した。

10

【0606】

PCR増幅及びサンガーシーケンシングによる編集分析

異なるsgRNAによって標的化されたHAO-1遺伝子配列を、表18のエクソン特異的プライマー及びPhusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher)を使用して、精製されたゲノムDNAからPCRによって増幅した。

20

【0607】

30

40

50

## 【表 2 5】

表 1 8 : 最初の 4 つのエクソンの各々で P C R に使用し、サンガーシーケンシングに使用し、ヒト H A O 1 遺伝子用に設計したプライマー

| 標的エクソン         | 使用        | プライマー名          | プライマー配列                     |
|----------------|-----------|-----------------|-----------------------------|
| ヒト HAO1 エクソン 1 | フォワード PCR | PCR_hHe1_F_+490 | TTTCATGGATGCCCCGTTCA        |
|                | リバーズ PCR  | PCR_hHe1_R_-412 | ACGAAAAGCCAGCAGGAAGA        |
|                | シーケンシング   | Seq_hHe1_R_-121 | AGCCCCAAGAACTTTTCCT         |
| ヒト HAO1 エクソン 2 | フォワード PCR | PCR_hHe2_F_+391 | TGCATCAGTGGTTGTCAGGG        |
|                | リバーズ PCR  | PCR_hHe2_R_-387 | CCTAGCTGTGACTTTGGGCA        |
|                | シーケンシング   | Seq_hHe2_R_-152 | TGGAAAGAAGAGGAGCAGGAC       |
| ヒト HAO1 エクソン 3 | フォワード PCR | PCR_hHe3_F_+238 | AGGCTGGATGTTCAGGTTCTT       |
|                | リバーズ PCR  | PCR_hHe3_R_-212 | TCCCAAAGCCAAAGCCCTTA        |
|                | シーケンシング   | Seq_hHe3_F_+186 | AGCAGAAATAACTCCAGTAGCCA     |
| ヒト HAO1 エクソン 4 | フォワード PCR | PCR_hHe4_F_+324 | GCTGGCTGAAAATCGTGTCAA       |
|                | リバーズ PCR  | PCR_hHe4_R_-348 | TCCTTGGGGCTTCTCTTTGG        |
|                | シーケンシング   | Seq_hHe4_F_+174 | ACTGATTAAGACCACTAGAGTATCACA |

10

20

30

## 【0608】

DNA clean & concentrator 5 (Zymo Research) を使用して P C R 産物を精製及び濃縮し、40 ng の P C R 産物をサンガーシーケンシング (E L I M Biosciences) に供した。

## 【0609】

サンガーシーケンシングクロマトグラムは、Brinkman et al. (Nucleic Acids Res. 2014 Dec 16; 42 (22) : e168. Published online 2014 Oct 9. doi : 10.1093/nar/gku936) によって記載されるように、Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE) と呼ばれるアルゴリズムによって各 sgRNA の予測される標的部位での挿入及び欠失 (インデル) について分析した。このスクリーニングから、ガイド h H 3 6 4 - 1、1 4、及び 1 5 は、Hep 3 B 細胞において最も高い編集活性を有することが特定された (図 1 9 及び表 1 9) 。

40

## 【0610】

50

【表 2 6 - 1】

表 1 9 : mRNA トランスフェクションにより送達されたヒト HAO1 遺伝子における M  
G 3 - 6 ガイドの編集活性

| ガイド<br>名 | PAM         | スパーサー配列                     | Hep3B における編<br>集活性<br>(平均インデル%) | スパーサー配列の<br>配列番号 |
|----------|-------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------|
| hH36-1   | ACAGGT<br>T | AATTAGCCGGGGGAGCAT<br>TTTC  | 34.0                            | 11773            |
| hH36-2   | ATAGAC<br>T | CCCAGACCTGTAATAGTC<br>ATAT  | 0.0                             | 11774            |
| hH36-3   | ACAGGT<br>C | CCAAAGTCTATATATGAC<br>TATT  | 4.0                             | 11775            |
| hH36-4   | CCAGAC<br>C | CAAAGTTTCTTCATCATTT<br>GCC  | 0.0                             | 11776            |
| hH36-5   | ACAGAT<br>C | GATGCTCCGGAATGTTGC<br>TGAA  | 0.0                             | 11777            |
| hH36-6   | ACAGAT<br>C | CTCTGTCCTAAAACAGAA<br>GTCG  | 0.0                             | 11778            |
| hH36-7   | GAGGGT<br>C | TGTCGACTTCTGTTTTAG<br>GACA  | 1.0                             | 11779            |
| hH36-8   | GGGGGC<br>T | GGGTCAGCATGCCAATAT<br>GTGT  | 10.5                            | 11780            |
| hH36-9   | ACAGGC<br>T | TCATGCCCCGTTCCCAGGG<br>ACTG | 0.0                             | 11781            |
| hH36-10  | AGGGAC<br>T | ACTCAACATCATGCCCGT<br>TCCC  | 0.0                             | 11782            |
| hH36-11  | CTGGGC<br>C | GAACGGGCATGATGTTGA<br>GTTC  | 0.0                             | 11783            |
| hH36-12  | CAGGAC<br>C | AGTTGCAGCCAACGAAGT<br>GCCT  | 0.0                             | 11784            |
| hH36-13  | AAGGAC<br>C | TTGGCTGCAACTGTATAT<br>CTAC  | 0.0                             | 11785            |
| hH36-14  | ATGGGC<br>T | GCTAGTGCGGCAGGCAG<br>AGAAG  | 19.5                            | 11786            |
| hH36-15  | CAAGGC<br>C | GGCAGGCAGAGAAGATG<br>GGCTA  | 14.5                            | 11787            |
| hH36-16  | ACAGAT<br>T | AACCGTCTGGATGATGTG<br>CGTA  | 0.0                             | 11788            |

【 0 6 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 6 - 2】

| ガイド名    | PAM         | スペーサー配列                    | Hep3B における編集活性<br>(平均インデル%) | スペーサー配列の<br>配列番号 |
|---------|-------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|
| hH36-17 | GTGGAC<br>T | GAGGAAAATTTTGGAGAC<br>GACA | 0.0                         | 11789            |
| hH36-18 | ATAGAC<br>C | TGCTGCATATGTGGCTAA<br>AGCA | 0.0                         | 11790            |
| hH36-19 | ATGGGT<br>C | TTGATATCTTCCCAGCTG<br>ATAG | 8.5                         | 11791            |
| hH36-20 | GAAGAC<br>T | TGGGAAGATATCAAATGG<br>CTGA | 0.0                         | 11792            |
| hH36-21 | AGAGGT<br>T | AATTGTTGCAAAGGGCAT<br>TTTG | 5.0                         | 11793            |

10

## 【 0 6 1 2 】

実施例 2 7 - ヒト G P R 1 4 6 の D N A レベルでの遺伝子編集結果

20

MG3-6 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) (配列番号 11374 ~ 11405) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して Hep3B 細胞 (100,000) に行った。トランスフェクションの 3 日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 11406 ~ 11437)。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 20)。

## 【 0 6 1 3 】

【表 2 7 - 1】

30

表 20 : G P R 1 4 6 を標的とする場合の実施例 2 5 のガイド RNA 及び標的とした配列

| 配列番号  | 名称                    | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11374 | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A1 | mA*mG*mC*rUrGrCrArGrCrUrGrGrUrUrCrArArCrGrGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11375 | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B1 | mG*mG*mU*rGrGrArGrGrArGrCrUrGrCrCrUrGrCrCrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11376 | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C1 | mC*mC*mU*rGrCrCrUrGrCrCrArGrGrArCrCrUrGrCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC                                                                                  |

40

## 【 0 6 1 4 】

50

【表 27-2】

| 配列<br>番号 | 名称                    | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                       | rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                |
| 11377    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D1 | mG*mG*mG*rGrCrUrGrUrCrArCrUrGrUrUrGrUrCrGrCrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11378    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E1 | mG*mG*mG*rCrCrUrGrGrUrGrGrUrGrGrGrCrGrUrGrCrCrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11379    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F1 | mU*mG*mG*rUrGrCrUrGrGrCrCrArArCrCrUrArCrArCrArG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11380    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G1 | mG*mU*mA*rCrUrUrUrGrUrCrArArCrArUrGrGrCrArGrUr<br>GrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArAr<br>UrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrU<br>rCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrAr<br>GrCrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11381    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H1 | mG*mC*mG*rGrCrGrArArGrUrCrCrArCrGrUrGrGrCrArCrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11382    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A2 | mA*mC*mU*rArCrArUrCrGrArGrCrGrUrGrCrArCrUrGrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11383    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B2 | mC*mG*mU*rCrCrGrCrArGrGrGrArGrGrArCrArCrGrCrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11384    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C2 | mG*mG*mA*rCrArCrGrCrCrCrUrGrGrArCrCrGrGrGrArC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11385    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D2 | mG*mG*mC*rCrGrGrCrUrGrGrArGrCrCrUrCrGrGrCrArC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11386    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E2 | mG*mU*mG*rGrCrCrArCrCrGrUrGrUrGrCrArCrCrGrCrArGrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr                                   |

10

20

30

40

【0615】

【表 2 7 - 3】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                        | CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                   |
| 11387    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-F2 | mA*mA*mG*rCrCrCrGrUrGrGrArCrCrArCrArCrUrArCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11388    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-G2 | mC*mC*mU*rGrGrGrGrCrUrArCrUrGrCrArCrUrUrUrGrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11389    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-H2 | mG*mC*mU*rGrArUrGrArArArArGrCrUrGrCrCrCrUrGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11390    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-A3 | mC*mU*mG*rCrGrGrGrGrArCrCrGrGrCrArCrUrGrCrUrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11391    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-B3 | mG*mU*mG*rGrUrGrUrCrArCrArArArGrCrUrGrCrUrGrGr<br>ArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArAr<br>UrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrU<br>rCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrAr<br>GrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11392    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-C3 | mU*mA*mG*rCrCrCrCrArGrGrUrArGrUrGrUrGrCrGrUrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11393    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-D3 | mA*mG*mA*rUrGrArUrGrArCrCrGrUrGrUrGrCrCrCrArG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11394    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-E3 | mG*mG*mC*rCrArCrCrArGrCrArGrCrCrUrGrUrGrUrGrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11395    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-F3 | mG*mC*mG*rUrGrUrUrGrUrArCrArCrGrCrUrGrGrCrCrArU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11396    | MG3-6-ヒ ト<br>GPR146-G3 | mA*mG*mU*rGrCrArCrGrCrUrCrGrArUrGrUrArGrUrGrGr<br>UrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArAr<br>UrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrU<br>rCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrAr<br>GrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |

10

20

30

40

【 0 6 1 6 】

【表 2 7 - 4】

| 配列<br>番号 | 名称                    | 配列                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11397    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H3 | mC*mC*mA*rCrCrArGrUrGrArGrArCrArCrArUrUrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 11398    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A4 | mU*mG*mA*rArGrGrGrGrArUrCrUrGrCrArGrUrGrCrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11399    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B4 | mC*mA*mC*rArGrCrGrCrCrCrArCrCrGrGrGrArGrCrUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11400    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C4 | mU*mC*mG*rGrGrGrGrGrCrCrGrArGrCrArGrGrUrGrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11401    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D4 | mA*mC*mA*rGrGrGrGrCrCrArGrGrGrCrCrUrGrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 11402    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E4 | mA*mU*mG*rGrUrCrArUrGrCrUrGrGrCrCrUrUrGrCrUrGrUrGrUrUrGrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11403    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F4 | mA*mG*mC*rArCrCrArGrCrArGrGrGrCrGrUrUrGrUrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11404    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G4 | mA*mG*mG*rCrCrCrArCrUrGrGrCrArCrGrCrCrCrArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11405    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H4 | mG*mA*mC*rArArCrArGrUrGrArCrArGrCrCrCrArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 11406    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A1 | AGCTGCAGCTGGTTCAACGGCA                                                                                                                                                                                                                 |
| 11407    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B1 | GGTGGAGGAGCTGCCTGCCTGC                                                                                                                                                                                                                 |
| 11408    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C1 | CCTGCCTGCCAGGACCTGCAGC                                                                                                                                                                                                                 |

【 0 6 1 7 】

10

20

30

40

50

【表 27-5】

| 配列<br>番号 | 名称                    | 配列                      |
|----------|-----------------------|-------------------------|
| 11409    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D1 | GGGGCTGTCACTGTTGTCGCTG  |
| 11410    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E1 | GGGCCTGGTGGTGGGCGTGCCA  |
| 11411    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F1 | TGGTGCTGGCCAACCTACACAG  |
| 11412    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G1 | GTACTTTGTCAACATGGCAGTG  |
| 11413    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H1 | GCGGCGAAGTCCACGTGGCACT  |
| 11414    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A2 | ACTACATCGAGCGTGCACTGCC  |
| 11415    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B2 | CGTCCGCAGGGAGGACACGCCC  |
| 11416    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C2 | GGACACGCCCCCTGGACCGGGAC |
| 11417    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D2 | GGCCGGCTGGAGCCCTCGGCAC  |
| 11418    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E2 | GTGGCCACCGTGTGCACGCAGT  |
| 11419    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F2 | AAGCCCGTGGACGCACACTACC  |
| 11420    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G2 | CCTGGGGCTACTGCACTTTGTG  |
| 11421    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H2 | GCTGATGAAAAAGCTGCCCTGC  |
| 11422    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A3 | CTGCGGGGACCGGCACTGCTCC  |
| 11423    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B3 | GTGGTGTCAAAAAGCTGCTGGA  |
| 11424    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C3 | TAGCCCCAGGTAGTGTGCGTCC  |
| 11425    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D3 | AGATGATGACCGTGTGCCCCAG  |
| 11426    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E3 | GGCCACCAGCAGCCTGTGTGCC  |
| 11427    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F3 | GCGTGTGTACACGCTGGCCAT   |
| 11428    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G3 | AGTGCACGCTCGATGTAGTGGT  |
| 11429    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H3 | CCACCAGTGAGGACACATTGAA  |
| 11430    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-A4 | TGAAGGGGATCTGCAGTGCCAC  |
| 11431    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-B4 | CACAGCGCCCCACGGGAGCTCG  |
| 11432    | MG3-6-ヒト<br>GPR146-C4 | TCGGGGGGCCGAGCAGGTGCAC  |

10

20

30

40

【0618】

50

【表 2 7 - 6】

| 配列番号                                                   | 名称                    | 配列                     |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 11433                                                  | MG3-6-ヒト<br>GPR146-D4 | ACAGGGGCCAGGGCGCTGAGCA |
| 11434                                                  | MG3-6-ヒト<br>GPR146-E4 | ATGGTCATGCTGGCCTTGCTGT |
| 11435                                                  | MG3-6-ヒト<br>GPR146-F4 | AGCACCAGCAGGGCGTTGTAGC |
| 11436                                                  | MG3-6-ヒト<br>GPR146-G4 | AGGCCCACTGGCACGCCCACCA |
| 11437                                                  | MG3-6-ヒト<br>GPR146-H4 | GACAACAGTGACAGCCCCAGCT |
| r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2'-フルオロ修飾塩基、*=ホスホロチオエート結合 |                       |                        |

10

## 【0 6 1 9】

実施例 2 8 - H e p a 1 - 6 細胞におけるマウス G P R 1 4 6 の D N A レベルでの遺伝子編集結果

MG3-6 RNP (104 pmol のタンパク質 / 120 pmol のガイド) (配列番号 11438 ~ 11472) のヌクレオフェクションを、Lonza 4D エレクトロポレーターを使用して H e p a 1 - 6 細胞 (100,000) に行った。トランスフェクションの5日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを作製し、最適化し、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した (配列番号 11473 ~ 11507)。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 2 1)。

20

## 【0 6 2 0】

【表 2 8 - 1】

表 2 1 : G P R 1 4 6 を標的とする場合の実施例 2 5 のガイド RNA 及び標的とした配列

30

| 配列番号  | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11438 | MG3-6-マウス<br>GPR146-A1 | mG*mU*mG*rGrCrCrArCrUrCrArArCrArGrCrArCrArGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11439 | MG3-6-マウス<br>GPR146-B1 | mC*mC*mG*rCrUrGrUrGrCrCrGrGrArArCrCrUrGrCrGrCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11440 | MG3-6-マウス<br>GPR146-C1 | mG*mC*mC*rGrGrArArCrCrUrGrCrGrCrCrUrGrGrGrGrCrU<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr                                     |

40

## 【0 6 2 1】

50

【表 28-2】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                        | CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                   |
| 11441    | MG3-6-マウス<br>GPR146-D1 | mU*mC*mU*rCrGrCrUrGrCrUrCrUrArCrCrUrGrGrGrGrGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11442    | MG3-6-マウス<br>GPR146-E1 | mG*mG*mG*rGrGrCrArGrGrGrGrUrCrCrCrUrGrUrGrArGrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11443    | MG3-6-マウス<br>GPR146-F1 | mU*mA*mC*rUrUrCrGrUrGrArArCrArUrGrGrCrCrGrUrGrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11444    | MG3-6-マウス<br>GPR146-G1 | mG*mG*mC*rArCrUrGrGrCrArCrCrUrGrCrGrUrArCrCrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11445    | MG3-6-マウス<br>GPR146-H1 | mU*mG*mU*rUrGrGrGrCrCrCrUrGrCrCrCrArCrUrCrCrArG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11446    | MG3-6-マウス<br>GPR146-A2 | mG*mG*mG*rCrCrUrGrUrGrGrArGrCrCrUrCrArGrCrArG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11447    | MG3-6-マウス<br>GPR146-B2 | mU*mG*mU*rGrCrUrCrArUrCrGrGrCrUrArCrGrUrGrUrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11448    | MG3-6-マウス<br>GPR146-C2 | mA*mA*mU*rCrGrGrGrArArGrGrArArGrArCrArCrArCrC<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11449    | MG3-6-マウス<br>GPR146-D2 | mA*mC*mA*rCrCrCrUrGrGrArCrCrArGrGrArCrArCrCrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11450    | MG3-6-マウス<br>GPR146-E2 | mC*mC*mU*rGrGrArCrCrArGrGrArCrArCrArGrCrArGrG<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |

10

20

30

40

【0622】

【表 28-3】

| 配列番号  | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11451 | MG3-6-マウス<br>GPR146-F2 | mA*mG*mC*rArGrGrCrUrGrGrArCrCrCrUrCrGrGrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11452 | MG3-6-マウス<br>GPR146-G2 | mA*mC*mA*rCrArGrUrGrCrUrGrArCrGrUrCrArCrGrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11453 | MG3-6-マウス<br>GPR146-H2 | mA*mG*mG*rGrGrCrArUrUrArUrCrUrGrGrGrCrArUrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11454 | MG3-6-マウス<br>GPR146-A3 | mU*mC*mU*rGrGrGrCrArUrCrCrUrArCrArGrGrUrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11455 | MG3-6-マウス<br>GPR146-B3 | mG*mC*mC*rArUrCrArCrCrUrGrCrUrGrUrArUrCrCrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11456 | MG3-6-マウス<br>GPR146-C3 | mU*mC*mA*rGrCrCrGrCrCrGrGrArGrCrUrUrGrCrCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11457 | MG3-6-マウス<br>GPR146-D3 | mG*mU*mG*rGrUrGrUrCrArCrArGrArArCrUrGrCrUrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11458 | MG3-6-マウス<br>GPR146-E3 | mC*mU*mU*rGrArGrArArGrGrCrCrArGrGrArArCrUrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11459 | MG3-6-マウス<br>GPR146-F3 | mC*mG*mU*rGrArCrGrUrCrArGrCrArCrUrGrUrGrUrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11460 | MG3-6-マウス<br>GPR146-G3 | mA*mG*mG*rCrUrCrArArGrUrArGrUrArArGrGrUrGrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11461 | MG3-6-マウス              | mG*mC*mC*rArCrCrArGrCrArGrCrCrUrGrUrGrCrArCrCrG                                                                                                                                                                                    |

10

20

30

40

【0623】

【表 28-4】

| 配列番号  | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                               |
|-------|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | GPR146-H3              | rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                          |
| 11462 | MG3-6-マウス<br>GPR146-A4 | mA*mG*mU*rGrCrCrArGrGrGrCrArUrArCrArCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU       |
| 11463 | MG3-6-マウス<br>GPR146-B4 | mA*mG*mG*rGrCrArCrGrCrUrCrGrArUrGrUrArGrUrArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11464 | MG3-6-マウス<br>GPR146-C4 | mU*mG*mA*rArCrArGrGrArUrGrArGrCrArGrUrGrUrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11465 | MG3-6-マウス<br>GPR146-D4 | mA*mG*mU*rGrUrCrArCrArUrGrGrGrCrCrUrCrArCrUrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11466 | MG3-6-マウス<br>GPR146-E4 | mG*mG*mG*rCrCrUrCrArCrUrGrCrUrGrArGrGrCrUrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11467 | MG3-6-マウス<br>GPR146-F4 | mC*mA*mC*rArGrGrGrCrCrCrArCrCrUrGrGrArGrUrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11468 | MG3-6-マウス<br>GPR146-G4 | mA*mU*mG*rGrUrCrArUrGrGrUrGrUrUrCrUrUrGrCrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11469 | MG3-6-マウス<br>GPR146-H4 | mG*mA*mG*rCrArUrUrArUrArGrCrCrUrArArGrCrUrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU   |
| 11470 | MG3-6-マウス<br>GPR146-A5 | mC*mU*mG*rCrCrCrCrArGrGrUrArGrArGrCrArGrCrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrGrUrCrCrGrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU     |
| 11471 | MG3-6-マウス<br>GPR146-B5 | mG*mA*mG*rArGrGrArCrCrCrArCrArGrCrCrCrArGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUr                                                                                                                                   |

10

20

30

40

【0624】

50

【表 2 8 - 5】

| 配列<br>番号 | 名称                     | 配列                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                        | ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU                                                                                                   |
| 11472    | MG3-6-マウス<br>GPR146-C5 | mU*mC*mA*rGrCrCrArCrGrCrUrGrUrGrCrUrGrUrGrA<br>rGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrArArUr<br>ArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrC<br>rUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGr<br>CrGrGrGrCrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU |
| 11473    | MG3-6-マウス<br>GPR146-A1 | GTGGCCCACTCAACAGCACAGC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11474    | MG3-6-マウス<br>GPR146-B1 | CCGCTGTGCCGGAACCTGCGCC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11475    | MG3-6-マウス<br>GPR146-C1 | GCCGGAACCTGCGCCTGGGGCT                                                                                                                                                                                                                     |
| 11476    | MG3-6-マウス<br>GPR146-D1 | TCTCGCTGCTCTACCTGGGGGC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11477    | MG3-6-マウス<br>GPR146-E1 | GGGGGCAGGGGTCCCTGTGAGC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11478    | MG3-6-マウス<br>GPR146-F1 | TACTTCGTGAACATGGCCGTGG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11479    | MG3-6-マウス<br>GPR146-G1 | GGCACTGGCACCTGCGTACCTG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11480    | MG3-6-マウス<br>GPR146-H1 | TGTTGGGCCCTGCCCCACTCCAG                                                                                                                                                                                                                    |
| 11481    | MG3-6-マウス<br>GPR146-A2 | GGGCCCTGTGGAGCCTCAGCAG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11482    | MG3-6-マウス<br>GPR146-B2 | TGTGCTCATCGGCTACGTGGTG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11483    | MG3-6-マウス<br>GPR146-C2 | AATCGGGAAGGAAGACACACCC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11484    | MG3-6-マウス<br>GPR146-D2 | ACACCCCTGGACCAGGACACCA                                                                                                                                                                                                                     |
| 11485    | MG3-6-マウス<br>GPR146-E2 | CCTGGACCAGGACACCAGCAGG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11486    | MG3-6-マウス<br>GPR146-F2 | AGCAGGCTGGACCCCTCGGTGC                                                                                                                                                                                                                     |
| 11487    | MG3-6-マウス<br>GPR146-G2 | ACACAGTGCTGACGTCACGGGG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11488    | MG3-6-マウス<br>GPR146-H2 | AGGGGCATTATCTGGGCATCCT                                                                                                                                                                                                                     |
| 11489    | MG3-6-マウス<br>GPR146-A3 | TCTGGGCATCCTACAGGTTGCT                                                                                                                                                                                                                     |
| 11490    | MG3-6-マウス<br>GPR146-B3 | GCCATCACCTGCTGTATCCCCG                                                                                                                                                                                                                     |
| 11491    | MG3-6-マウス<br>GPR146-C3 | TCAGCCGCCGAGCTTGCCGGG                                                                                                                                                                                                                      |
| 11492    | MG3-6-マウス<br>GPR146-D3 | GTGGTGTACAGAACTGCTTGA                                                                                                                                                                                                                      |

【 0 6 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 28-6】

| 配列<br>番号                                                    | 名称                     | 配列                     |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 11493                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-E3 | CTTGAGAAGGCCAGGAACTTGG |
| 11494                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-F3 | CGTGACGTCAGCACTGTGTGCC |
| 11495                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-G3 | AGGCTCAAGTAGTAAGGTGTCC |
| 11496                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-H3 | GCCACCAGCAGCCTGTGCACCG |
| 11497                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-A4 | AGTGCCAGGGCATACAACACAG |
| 11498                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-B4 | AGGGCACGCTCGATGTAGTAGT |
| 11499                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-C4 | TGAACAGGATGAGCAGTGTAC  |
| 11500                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-D4 | AGTGTCACATGGGCCTCACTGC |
| 11501                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-E4 | GGGCCTCACTGCTGAGGCTCCA |
| 11502                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-F4 | CACAGGGCCACCTGGAGTGGG  |
| 11503                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-G4 | ATGGTCATGGTGTCTTGCTGG  |
| 11504                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-H4 | GAGCATTATAGCCTAAGCTCAC |
| 11505                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-A5 | CTGCCCCCAGGTAGAGCAGCGA |
| 11506                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-B5 | GAGAGGACCCACAGCCCCAGGC |
| 11507                                                       | MG3-6-マウス<br>GPR146-C5 | TCAGCCCACGCTGTGCTGTTGA |
| r=天然のリボース塩基、m=2' -O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、*=ホスホロ<br>チオエート結合 |                        |                        |

10

20

30

## 【0626】

実施例 29-初代マウス肝細胞におけるマウス G P R 1 4 6 の D N A レベルでの遺伝子編集結果

MG3-6 mRNA 及び ガイド (0.42 ug の mRNA、1:20 のヌクレアーゼ:ガイドのモル比) の Messenger Max を用いたリポフェクションを、上記の実施例 28 に記載されるガイド RNA を使用して、初代マウス肝細胞 (1E5 生細胞/ガイド) において行った。トランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノム DNA を調製した。NGS ベースの DNA シーケンシングでの使用に適した PCR プライマーを、各ガイド RNA の個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンを Illumina MiSeq マシンでシーケンシングし、専用の Python スクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した (図 22)。結果は、G P R 1 4 6 - H 2 s g R N A がマウス肝細胞における編集に非常に有効であることを示した。

40

## 【0627】

実施例 30-K562 細胞における T R A C 及び A A V S 1 の D N A レベルでの遺伝子編集結果

MG14-241 及び MG99-1 mRNA のヌクレオフェクションを、マッチング

50

するガイドRNA（500 ngのmRNA／150 pmolのガイド）とともに、Lonza 4Dエレクトロポレーターを使用して200,000個のヒトリンパ芽球細胞（K562細胞）に行った。トランスフェクションの3日後に細胞を採取し、ゲノムDNAを調製した。NGSベースのDNAシーケンシングでの使用に適したPCRプライマーを作製し、最適化し、各ガイドRNAの個々の標的配列を増幅するために使用した。アンプリコンをIllumina MiSeqマシンでシーケンシングし、専用のPythonスクリプトを用いて分析して、遺伝子編集を測定した。（図23）。

【0628】

【表29-1】

表22：実施例30のガイドRNA及び標的とした配列

| 配列番号  | 名称                | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11508 | MG14-241-AAVS1-E2 | mU*mG*mG*rCrArCrArGrGrCrCrCrCrArGrArArGrGrArGrUrCrU<br>rUrGrCrCrGrGrArArArCrGrGrCrUrArGrArCrArArGrGrArArUr<br>CrGrCrUrUrUrArCrGrCrGrArUrUrArCrCrCrGrCrArArGrGrUrAr<br>ArGrCrCrCrGrUrCrArGrCrArCrCrUrUrGrGrUrGrUrCrGrGrCrGr<br>GrGrCrGrArUrCrCrU*mU*mU*mU                   |
| 11509 | MG14-241-AAVS1-F2 | mC*mC*mA*rCrUrArGrGrGrArCrArGrGrArUrUrGrGrUrGrUrCrU<br>rUrGrCrCrGrGrArArArCrGrGrCrUrArGrArCrArArGrGrArArUr<br>CrGrCrUrUrUrArCrGrCrGrArUrUrArCrCrCrGrCrArArGrGrUrAr<br>ArGrCrCrCrGrUrCrArGrCrArCrCrUrUrGrGrUrGrUrCrGrGrCrGr<br>GrGrCrGrArUrCrCrU*mU*mU*mU                   |
| 11510 | MG14-241-AAVS1-B2 | mA*mG*mG*rArGrArArCrGrGrGrUrGrUrCrCrArGrGrGrUrCrU<br>rUrGrCrCrGrGrArArArCrGrGrCrUrArGrArCrArArGrGrArArUr<br>CrGrCrUrUrUrArCrGrCrGrArUrUrArCrCrCrGrCrArArGrGrUrAr<br>ArGrCrCrCrGrUrCrArGrCrArCrCrUrUrGrGrUrGrUrCrGrGrCrGr<br>GrGrCrGrArUrCrCrU*mU*mU*mU                     |
| 11511 | MG14-241-AAVS1-E2 | TGGCACAGGCCCCAGAAGGA                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 11512 | MG14-241-AAVS1-F2 | CCACTAGGGACAGGATTGGT                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 11513 | MG14-241-AAVS1-B2 | AGGAGAACGGGGTGTCCAGG                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 11514 | MG99-1-TRAC-G1    | mG*mA*mC*rArCrCrUrUrCrUrUrCrCrCrArGrCrCrArGrGrUr<br>GrUrUrUrArGrUrUrCrUrUrGrArUrGrArArArArUrCrArGrUrA<br>rArGrUrUrCrUrArArArArUrArArGrGrCrArUrUrArUrGrCrCrGrU<br>rGrGrGrUrArUrGrGrUrGrGrUrArUrCrCrUrCrGrUrUrCrArArUr<br>rArUrCrCrArCrCrGrUrUrCrUrArArArArArArUrCrGrCrGrCrG |

【0629】

【表29-2】

| 配列番号  | 名称             | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |                | rCrCrGrCrCrGrGrCrGrUrGrCrU*mU*mU*mU                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 11515 | MG99-1-TRAC-H6 | mC*mC*mC*rGrGrCrCrArCrUrUrCrArGrGrArGrGrArGrUr<br>rGrUrUrUrArGrUrUrCrUrUrGrArUrGrArArArArUrCrArGrUr<br>ArArGrUrUrCrUrArArArArUrArArGrGrCrArUrUrArUrGrCrCrGrU<br>rGrGrGrUrArUrGrGrUrGrGrUrArUrCrCrUrCrGrUrUrCrArArAr<br>UrArUrCrCrArCrCrGrUrUrCrUrArArArArArArUrCrGrCrGrCr<br>GrCrCrGrCrCrGrGrGrUrGrCrU*mU*mU*mU |
| 11516 | MG99-1-TRAC-G1 | GACACCTTCTTCCCCAGCCAGGT                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 11517 | MG99-1-TRAC-H6 | CCCGGCCACTTTCAGGAGGAGGAT                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

r=天然のリボース塩基、m=2'-O メチル修飾塩基、F=2' フルオロ修飾塩基、\*=ホスホロチオエート結合

10

20

30

40

50

## 【0630】

実施例31－新規タイプII CRISPRエフェクターは、多様なPAM要件を有する活性ヌクレアーゼである

MG3、MG15、MG150、MG123、MG124、及びMG125ファミリーの新規ヌクレアーゼを系統学的分析から特定した。ヌクレアーゼのMG150ファミリーは、特定された任意の他のファミリーよりもMG3ファミリーと密接に関連しており（図24）、分岐エフェクターの新しい群により、ヌクレアーゼのMG15ファミリーが拡張した（図25）。インビトロ切断活性アッセイは、本明細書に報告されたヌクレアーゼが一般に、PAMから3番目又は4番目の位置での切断の選択性を有することを示す（表23）。更に、NGSデータからのSeqLogo画像によって示されるように、タイプIIヌクレアーゼのPAM配列決定は、多様なPAM要件を示す。（図26～35）

10

## 【0631】

20

30

40

50

## 【表 3 0 - 1】

表 2 3 : MGファミリーバリエーションの切断部位

| 候補                  | NGS からの切断部位 | 候補                 | NGS からの切断部位 |
|---------------------|-------------|--------------------|-------------|
| MG1-2(配列番号 6)       | 3           | MG71-2             | 2 又は 3      |
| MG1-4(配列番号 1)       | 4           | MG72-1             | 3           |
| MG1-5(配列番号 2)       | 4           | MG73-1(配列番号 11720) | 3           |
| MG1-6(配列番号 3)       | 4           | MG73-2(配列番号 11721) | 3           |
| MG1-7(配列番号 4)       | 4           | MG74-1(配列番号 11722) | 3           |
| MG14-1(配列番号 678)    | 1 又は 3      | MG86-1(配列番号 11723) | 3           |
| MG14-241(配列番号 914)  | 3           | MG86-2(配列番号 11724) | 3           |
| MG14-244(配列番号 917)  | 3           | MG87-1(配列番号 11725) | 3           |
| MG14-246(配列番号 919)  | 3           | MG87-2(配列番号 11726) | 3           |
| MG14-248(配列番号 921)  | 3           | MG87-3(配列番号 11727) | 3           |
| MG14-5(配列番号 681)    | 3           | MG88-1(配列番号 11728) | 3           |
| MG15-1(配列番号 930)    | 1 又は 3      | MG88-2(配列番号 11729) | 3           |
| MG15-115(配列番号 1042) | 3           | MG88-3(配列番号 11730) | 3           |
| MG15-135(配列番号 1062) | 3           | MG89-2(配列番号 11731) | 3           |
| MG15-54(配列番号 981)   | 3           | MG89-3(配列番号 11732) | 3           |
| MG15-66(配列番号 993)   | 3           | MG94-1(配列番号 11733) | 3           |
| MG15-94(配列番号 1021)  | 3           | MG94-2(配列番号 8748)  | 3           |
| MG16-1(配列番号 11718)  | 1 又は 3      | MG95-1(配列番号 8782)  | 3           |
| MG16-2(配列番号 1093)   | 3           | MG95-2(配列番号 8783)  | 3           |
| MG16-3(配列番号 11734)  | 3           | MG96-1(配列番号 8786)  | 3           |
| MG17-2(配列番号 7700)   | 3           | MG98-1(配列番号 8819)  | 3           |
| MG18-1(配列番号 1354)   | 1 又は 3      | MG98-2(配列番号 8820)  | 3           |
| MG2-4(配列番号 11735)   | 1 又は 3      | MG99-1(配列番号 11748) | 3           |
| MG2-5(配列番号 323)     | 3           | MG100-1(配列番号 8960) | 3           |

【 0 6 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 2】

|                     |        |                     |   |
|---------------------|--------|---------------------|---|
| MG2-55(配列番号 371)    | 3      | MG100-2(配列番号 8961)  | 3 |
| MG2-7(配列番号 321)     | 3      | MG111-1(配列番号 9037)  | 3 |
| MG21-1(配列番号 1512)   | 1 又は 3 | MG111-2(配列番号 9038)  | 3 |
| MG21-2(配列番号 11736)  | 3      | MG112-3(配列番号 11749) | 3 |
| MG21-3(配列番号 1513)   | 3      | MG116-1(配列番号 9150)  | 3 |
| MG21-97(配列番号 1607)  | 3      | MG123-1(配列番号 11750) | 3 |
| MG22-1(配列番号 1656)   | 1 又は 3 | MG124-2(配列番号 11751) | 3 |
| MG22-2(配列番号 11737)  | 3      | MG125-1(配列番号 11752) | 3 |
| MG22-3(配列番号 1657)   | 3      | MG125-2(配列番号 11753) | 3 |
| MG23-1(配列番号 1756)   | 3      | MG125-3(配列番号 11754) | 3 |
| MG23-2(配列番号 11738)  | 3      | MG125-4(配列番号 11755) | 3 |
| MG23-3(配列番号 1757)   | 3      | MG125-5(配列番号 11756) | 3 |
| MG3-1_ロング(配列番号 424) | 3      | MG150-5(配列番号 7363)  | 3 |
| MG3-3(配列番号 11739)   | 3      | MG150-6(配列番号 7364)  | 3 |
| MG3-4(配列番号 11740)   | 3      | MG150-7(配列番号 7365)  | 3 |
| MG3-42(配列番号 429)    | 3 又は 4 | MG150-8(配列番号 7366)  | 3 |
| MG3-6(配列番号 426)     | 3      | MG150-9(配列番号 7367)  | 3 |
| MG3-7(配列番号 422)     | 3      | MG3-18(配列番号 11757)  | 3 |
| MG3-8(配列番号 428)     | 3      | MG3-89(配列番号 11758)  | 3 |
| MG4-2(配列番号 11741)   | 2 又は 3 | MG3-90(配列番号 11759)  | 3 |
| MG4-5(配列番号 432)     | 1 又は 3 | MG3-91(配列番号 11760)  | 3 |
| MG40-1(配列番号 5718)   | 3      | MG3-92(配列番号 11761)  | 3 |
| MG40-2(配列番号 5719)   | 3      | MG3-93(配列番号 11762)  | 3 |
| MG40-3(配列番号 5720)   | 3      | MG3-95(配列番号 11763)  | 3 |

【 0 6 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 0 - 3】

|                       |   |                          |   |
|-----------------------|---|--------------------------|---|
| MG40-4(配列番号<br>5721)  | 3 | MG3-96(配列番号<br>11764)    | 3 |
| MG40-5(配列番号<br>5722)  | 3 | MG3-103(配列番<br>号 11765)  | 3 |
| MG40-6(配列番号<br>5723)  | 3 | MG15-130(配列番<br>号 1057)  | 3 |
| MG43-3(配列番号<br>8359)  | 3 | MG15-146(配列番<br>号 1073)  | 3 |
| MG44-1(配列番号<br>11742) | 3 | MG15-164(配列番<br>号 1091)  | 3 |
| MG46-1(配列番号<br>11743) | 3 | MG15-166(配列番<br>号 11766) | 3 |
| MG47-1(配列番号<br>5751)  | 3 | MG15-171(配列番<br>号 7605)  | 3 |
| MG47-2(配列番号<br>5752)  | 3 | MG15-172(配列番<br>号 7606)  | 3 |
| MG48-1(配列番号<br>5769)  | 3 | MG15-174(配列番<br>号 7608)  | 3 |
| MG48-3(配列番号<br>5771)  | 3 | MG15-184(配列番<br>号 7618)  | 3 |
| MG49-1(配列番号<br>5805)  | 3 | MG15-187(配列番<br>号 7621)  | 3 |
| MG49-2(配列番号<br>5806)  | 3 | MG15-191(配列番<br>号 11767) | 2 |
| MG50-1(配列番号<br>5824)  | 3 | MG15-193(配列番<br>号 11768) | 3 |
| MG51-1(配列番号<br>5827)  | 3 | MG15-195(配列番<br>号 11769) | 3 |
| MG52-1(配列番号<br>5831)  | 2 | MG15-217(配列番<br>号 11770) | 3 |
| MG6-3(配列番号<br>11744)  | 1 | MG15-218(配列番<br>号 11771) | 4 |
| MG6-5(配列番号<br>11745)  | 3 | MG15-219(配列番<br>号 11772) | 4 |
| MG7-1(配列番号<br>11746)  | 3 | MG15-177(配列番<br>号 7611)  | 3 |
| MG71-1(配列番号<br>11747) | 3 |                          |   |

10

20

30

## 【 0 6 3 4】

40

## 実施形態

以下の実施形態は本質的に例示であり、決して限定することを意図したものではない。

1. 細胞における B 2 M 遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

(a) RNA ガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイド RNA であって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該 B 2 M 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスペーサー配列を含む、操作されたガイド RNA を、接触させることを含み、

当該 B 2 M 遺伝子座の当該領域が、配列番号 6 3 8 7 ~ 6 4 6 8 のうちのいずれか 1 つの少なくとも 1 8 個の連続するヌクレオチドと少なくとも 8 5 % の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

50

2. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態1に記載の方法。

3. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、実施形態1に記載の方法。

4. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、実施態様3に記載の方法。

5. 当該操作されたガイドRNAが、配列番号6305～6386のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、実施形態1に記載の方法。

6. 当該B2M遺伝子座の当該領域が、配列番号6388、6399、6401、6403、6410、6413、6421、6446、及び6448のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、実施形態1に記載の方法。

7. 細胞におけるTRAC遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該TRAC遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

当該TRAC遺伝子座の当該領域が、配列番号6509～6548のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

8. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態7に記載の方法。

9. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、実施形態7に記載の方法。

10. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、実施態様9に記載の方法。

11. 当該操作されたガイドRNAが、配列番号6469～6508のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、実施形態7に記載の方法。

12. 当該TRAC遺伝子座の当該領域が、配列番号6517、6520、及び6523のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、実施形態7に記載の方法。

13. 細胞におけるHPR T遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該HPR T遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

当該HPR T遺伝子座の当該領域が、配列番号6616～6682のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

14. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態13に記載の方法。

15. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むRuvCIIドメインを含む、実施形態13に記載の方法。

16. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、HNHドメインを更に含む、実施態様15に記載の方法。

17. 当該操作されたガイドRNAが、配列番号6549～6615のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、実施形態13に記載の方法。

10

20

30

40

50

18. 当該H P R T遺伝子座の当該領域が、配列番号6619、6634、6673、6675、及び6679のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、実施形態13に記載の方法。

19. 細胞におけるT R B C 1 / 2 遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該T R B C 1 / 2 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

10

当該T R B C 1 / 2 遺伝子座の当該領域が、配列番号6722~6760又は6782~6802のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

20. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態19に記載の方法。

21. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242又は配列番号2244と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むR u v C I I I ドメインを含む、実施形態19に記載の方法。

22. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、H N H ドメインを更に含む、実施態様21に記載の方法。

20

23. 当該操作されたガイドRNAが、配列番号6683~6721及び6761~6781のうちのいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する配列を含む、実施形態19に記載の方法。

24. 当該T R B C 1 / 2 遺伝子座の当該領域が、配列番号6734、6753、6790、及び6800のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、実施形態19に記載の方法。

25. 細胞におけるH A O 1 遺伝子座を編集する方法であって、当該細胞に、

(a) RNAガイドエンドヌクレアーゼ、及び

(b) 操作されたガイドRNAであって、当該エンドヌクレアーゼと複合体を形成するように構成されており、かつ当該H A O 1 遺伝子座の領域にハイブリダイズするように構成されているスパーサー配列を含む、操作されたガイドRNAを、接触させることを含み、

30

当該H A O 1 遺伝子座の当該領域が、配列番号11802~11820のうちのいずれか1つの少なくとも18個の連続するヌクレオチドと少なくとも85%の同一性を有する標的化配列を含む、方法。

26. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態25に記載の方法。

27. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号2242と少なくとも75%の配列同一性を有する配列を含むR u v C I I I ドメインを含む、実施形態25に記載の方法。

40

28. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、H N H ドメインを更に含む、実施態様27に記載の方法。

29. 当該H A O 1 遺伝子座の当該領域が、配列番号11806、11813、11816、及び11819のうちのいずれか1つの非縮重ヌクレオチドのうちの少なくとも19個と少なくとも75%、80%、又は90%同一である配列を含む、実施形態25に記載の方法。

30. 当該RNAガイドエンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態1に記載の方法。

31. 当該クラス2、タイプII Cas エンドヌクレアーゼが、配列番号421~431のうちのいずれか1つと少なくとも75%の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを

50

含む、実施形態 2 に記載の方法。

32. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421 と少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む、実施形態 1 ~ 4、30 ~ 31 のいずれか 1 つに記載の方法。

33. 当該操作されたガイド RNA が、配列番号 6305 ~ 6386 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む、実施形態 1 ~ 4、30 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の方法。

34. 当該操作されたガイド RNA が、配列番号 6306、6317、6319、6321、6328、6331、6339、6364、及び 6366 のうちのいずれか 1 つと 80 % 又は少なくとも 90 % 同一である配列を含む、実施形態 1 ~ 4、30 ~ 32 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

35. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態 7 に記載の方法。

36. 当該クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼが、配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 75 % の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態 8 に記載の方法。

37. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421 と少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む、実施形態 7 ~ 10、35 ~ 36 のいずれか 1 つに記載の方法。

38. 当該操作されたガイド RNA が、配列番号 6477、6480、及び 6483 のうちのいずれか 1 つと 80 % 又は少なくとも 90 % 同一である配列を含む、実施形態 7 ~ 10、35 ~ 37 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

39. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態 13 に記載の方法。

40. 当該クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼが、配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 75 % の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態 14 に記載の方法。

41. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421 又は配列番号 423 と少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む、実施形態 13 ~ 16、39 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の方法。

30

42. 当該操作されたガイド RNA が、配列番号 6552、6567、6606、6608、及び 6612 のうちのいずれか 1 つと 80 % 又は少なくとも 90 % 同一である配列を含む、実施形態 13 ~ 16、39 ~ 40 のいずれか 1 つに記載の方法。

43. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態 19 に記載の方法。

44. 当該クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼが、配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 75 % の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態 20 に記載の方法。

45. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421 又は配列番号 423 と少なくとも 75 %、80 %、又は 90 % 同一である配列を含む、実施形態 19 ~ 22、43 ~ 44 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

46. 当該操作されたガイド RNA が、配列番号 6695、6714、6769、及び 6779 のうちのいずれか 1 つと 80 % 又は少なくとも 90 % 同一である配列を含む、実施形態 19 ~ 22、43 ~ 45 のいずれか 1 つに記載の方法。

47. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、Cas エンドヌクレアーゼである、実施形態 25 に記載の方法。

48. 当該クラス 2、タイプ II Cas エンドヌクレアーゼが、配列番号 421 ~ 431 のうちのいずれか 1 つと少なくとも 75 % の配列同一性を有するエンドヌクレアーゼを含む、実施形態 26 に記載の方法。

49. 当該 RNA ガイドエンドヌクレアーゼが、配列番号 421 と少なくとも 75 %、8

50

0%、又は90%同一である配列を含む、実施形態25～28、47～48のいずれか1つに記載の方法。

50. 当該細胞が、末梢血単核細胞（PBM C）である、実施形態1～24、30～46のいずれか1つに記載の方法。

51. 当該細胞が、T細胞若しくはその前駆体、又は造血幹細胞（H S C）である、実施形態1～24、30～46のいずれか1つに記載の方法。

【0635】

本発明の好ましい実施形態は本明細書に示され、記載されるが、このような実施形態が、例示の目的でのみ提供されることは、当業者には明らかであろう。本発明は、本明細書内で提供される特定の実施例によって限定されることは意図されていない。本発明は前述の説明を参照して記載されているが、本明細書の実施形態の記載及び説明は、限定された意味で解釈されることを意図していない。多数の変形、変更、及び置換は、ここで、本発明から逸脱することなく、当業者にとって生じるであろう。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書に記載される特定の描写、構成又は相対的割合に限定されないことが理解されよう。本明細書に記載される本発明の実施形態に対する様々な代替が、本発明の実施に用いられ得ることは、理解されるべきである。したがって、本発明は、こうした任意の代替、修正、変形、又は均等物も包含することが企図される。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義し、これらの請求の範囲内の方法及び構造及びそれらの均等物がそれによって包含されることが意図される。

【0636】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1】

表 2 4 - 1 配列表に含まれない本明細書で言及される追加のタンパク質及び核酸配列のリスト

| WO 2023/028348           |       |                |        |      | PCT/US2022/041755 |  |  |  |  |
|--------------------------|-------|----------------|--------|------|-------------------|--|--|--|--|
| カテゴリー                    | 配列番号  | 説明             | タイプ    | 生物   | 配列                |  |  |  |  |
| MG123 :<br>活性エフェクター-P AM | 11518 | MG123-1 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnCAAA          |  |  |  |  |
| MG124 :<br>活性エフェクター-P AM | 11519 | MG124-2 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnATAA          |  |  |  |  |
| MG125 :<br>活性エフェクター-P AM | 11520 | MG125-1 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnATAA          |  |  |  |  |
| MG125 :<br>活性エフェクター-P AM | 11521 | MG125-2 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnGTACAA          |  |  |  |  |
| MG125 :<br>活性エフェクター-P AM | 11522 | MG125-3 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnRCAC          |  |  |  |  |
| MG125 :<br>活性エフェクター-P AM | 11523 | MG125-4 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnGnnA          |  |  |  |  |
| MG125 :<br>活性エフェクター-P AM | 11524 | MG125-5 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnCnnn          |  |  |  |  |
| MG150 :<br>活性エフェクター-P AM | 11525 | MG150-5 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnMCMnn          |  |  |  |  |
| MG150 :<br>活性エフェクター-P AM | 11526 | MG150-6 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRMYTnn          |  |  |  |  |
| MG150 :<br>活性エフェクター-P AM | 11527 | MG150-7 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnwMCTnn          |  |  |  |  |
| MG150 :<br>活性エフェクター-P AM | 11528 | MG150-8 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnwMCCnn          |  |  |  |  |
| MG150 :<br>活性エフェクター-P AM | 11529 | MG150-9 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnMCMnn          |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11530 | MG3-18 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRGGTY           |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11531 | MG3-89 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRwwYYn          |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11532 | MG3-90 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRmwYnn          |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11533 | MG3-91 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRwYCCn          |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11534 | MG3-92 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRGnCAn          |  |  |  |  |
| MG3 :<br>活性エフェクター-P AM   | 11535 | MG3-93 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnCACnn           |  |  |  |  |

【 0 6 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2】

| カテゴリ                 | 配列番号  | 説明              | タイプ    | 生物   | 配列       |                   |
|----------------------|-------|-----------------|--------|------|----------|-------------------|
|                      |       |                 |        |      |          |                   |
| MG3<br>活性エフェクター-PAM  | 11536 | MG3-95 3' PAM   | スクレオチド | 人工配列 | nnnMYAY  | WO 2023/028348    |
| MG3<br>活性エフェクター-PAM  | 11537 | MG3-96 3' PAM   | スクレオチド | 人工配列 | nRwYAYn  |                   |
| MG3<br>活性エフェクター-PAM  | 11538 | MG3-103 3' PAM  | スクレオチド | 人工配列 | nnRGCCCn |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11539 | MG15-130 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnCwAC |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11540 | MG15-146 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnGTRY |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11541 | MG15-164 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRnRYAW |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11542 | MG15-166 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnGYTA |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11543 | MG15-171 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnCWAW |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11544 | MG15-172 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnCCRCAT |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11545 | MG15-174 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRGAYA  |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11546 | MG15-184 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRnRYAA | PCT/US2022/041755 |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11547 | MG15-187 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnCAAn |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11548 | MG15-191 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | GnnnnCMA |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11549 | MG15-193 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRnRYAY |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11550 | MG15-195 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnnGAAA |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11551 | MG15-217 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnRoRTGA |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11552 | MG15-218 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnCnAT  |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11553 | MG15-219 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnRTATW |                   |
| MG15<br>活性エフェクター-PAM | 11554 | MG15-177 3' PAM | スクレオチド | 人工配列 | nnnSRYTA |                   |

【 0 6 3 8 】

【表 3 1 - 3】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------|-------|---------------|-------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG71 エプエクター | 11711 | MG71-2 エプエクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>MFNDLASKVNDNFNAVSFVENVYVRDEMGIEDWSCQNIDELAKVLCDD<br>VNLGRITTKOKAMOSLLPAOTKOOKAHQLEFSGGKAKLAELFVDEILD<br>ECEKSVSFQDDDLNEFEPLVTAALGERYEGLLRFKAIVDWSILAKIL<br>HLDTSSKDEDEQHLLSECKMQVYEDHKRDLAVLKSMGLKGPLYNNKIF<br>RQDGDISEYKAKGIKGRNQIDFCKDLKKQLEGIAEYKKIMQETISIDD<br>AKTEERLLFRITNGFAFPQTTKDNGIPIQVHIAELKCLDINAEGYLP<br>FLGETDNNGLSVREKIEQIVKFRIPYVVGPLAGTRMSREQGRCVWVRK<br>NEKIVPWNTFIVNLSEAEKFTNTAKCTVLVGEDVLPKESILYSEF<br>MVRNAINNTIVDGERLPVDVLEKIFKQLFLAKTSKVTCKTLERFRQE<br>NISFQNGIGGIDDKINASMKSYNDFRIFGEDYIQLIRDEIENIRWITLFC<br>DEKKCWSLK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MG73 エプエクター | 11712 | MG73-1 エプエクター | タンパク質 | 未知 | MTKILGLDLGIASVGYAVVNLDQKFDGGEILTAGVRIFEAAENPKDGG<br>ASLSAPRRARALRRILRRKTIQLQIRNLFIKYQILTTEELNHLAYSPL<br>PSVWEITLSLEYEKQPLQHILARALLHIAKRRGFRSMRKSAAEKNYETG<br>QLLOGISLQNLKQSGRQTIGEFYHLQSEPKRNRKAGSYNHSIARSM<br>LEEVRLLJEKQRTYGNATLSSEFEQFRAIAFDQDQPLKSPSSGKCTFLP<br>DEDRAPKQAYTAELFAALSKINIRIVSQGTSRAISADERQIALDLCLE<br>KENNFAQLRKLLEQENEFNISIYIPRAKQNTDYQPEKKTAVYKMT<br>GYHALRRKALKDHKPLWTTYNMDNPNGLDQIAVVLATFKSDKEINAL<br>EKLQFPSELIEAVKSLFSFGFMHLSLKAMRNINPILLEGHTYDKACELA<br>GYNFQAAKRNAGLTKLPPLTEENFITSPPVVKRSIAQTRKVVNALNRK<br>YGPFDVHIELAREMGRNWAOQKELTQOQKENQEERDLKAOQIEGL<br>FPKNSLBIKKIRLWKQGYCTYSNQYIKPEQILEEGYCQVDHIIPYSRS<br>FDNTLSNQVLCLTKENQDKNDIPEDYFQRIQRDWDVFTLVNASPTM<br>RPNKKQLLRTELSEEDLAGFKDRNLNDRHSSVFRKYLQLNLQNLIN<br>KYKQGYFCRNGKITADLRNMWGLSKIREQDDKHIALDAIVLACCNA<br>MMQOISTQYTHINKETAALKIKPLFPWPWKEFTDVENALLSIFVSRPP<br>RKKITGAFHKETIYYSAKHLARGFKTLTDITLTAEKAKQRDLKIKY<br>YGVERNKKLYDAIEQALLARTDAKQPLKVLGPAQTPVKKIKLIMEG<br>NKGVPVLKGTAVAENGAMPVVDYFYKNGTYFLVPVYTFDTEKELPLI<br>SIPDNQFMDVDRFESLYKDDYVOIKNKTGETFEGYFKQYNAQTQIY<br>LETHDRSDSYTVSGKPASEKKFSKSTFVDFTKYQIDILGNQHRVEKEY<br>TGIRKNKGFGG |
| MG89 エプエクター | 11713 | MG89-2 エプエクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MSYVLGLDLGIASVGWSIVEPGNRHIDLGVRVFKKAETDKGDPNLNLR<br>RESRLSRRLYRRARHLRSLNLFSSGLHHSKDEVLNKVNYPNPNWALR<br>TLGLNSVLNNQLARVYHICKIIRGYWASSADDGQADNGKIKKSLSS<br>NQLVMIKEKGYKTVGMHFTFVPCQRNKSSEYKSLPRTDIDKELRA<br>IPKAQQSFSNPVTKDFINAIVGCGDRKTGFLWEQRPALQGEDLLKMY<br>GHCRFEKDELAPAAANFYSEQLVWLTKINNLRVYDEDSQERPLTREER                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

【 0 6 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 4】

| カテゴリー        | 配列番号  | 説明            | タイプ             | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|-------|---------------|-----------------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |       |               |                 |    | WO 2023/028348<br>DLINMPLEMKSDIKYSSLTSAFEKANLWKSQPKYKSVDYEQTKKK<br>KNTAKSVDTITKSSKNPEDKVFYKSSHLHEIRKALGSSLSSEWEKIRTE<br>VLSGKYDRYNRIAYVLTVYKEDSDVIEQLSPYESRTILIEALLPVRSQFV<br>ALSEKSLKIDPIMV/LGKRYDEACSEANYKHQKQNAFKKLKYLPLPL<br>ESGREPNTLIFNEEIGDIPRNPVLRVINQTRKVVNAIVKKGSPKSVH<br>IELARDIAKSAERNEIEKNEEASRIHKEDEFEKLFKSCCLNGTNL<br>LKRYLYKEQDCKSMYSSEKIDHKLFEKGYVQIDHILPYSRSYDQSNS<br>KVLVTNENQDKGNRIPEYFEAKQHGFSEWYFEQWVKSCKNLNKK<br>KRNLLRCSLSKDAKDFLERNLNDTRYACRFVKNYIDSLFCLSENDSNS<br>GCVVVAGQLTAYLRNCWGLNKVRENDRIHALDATVIACCTRIKIVQ<br>KYGAWKSREMNSYSSYVDPSPVDEDEKLQKLKLYNTRKPPDFPKP<br>WECFRSEVESRFSALKEKLKQCSYTESELKNVRLTFVSRACE<br>KIGKGALHGDIVYRQTSERKENAVKVSIIKKLVARIEAIVDADT<br>RNKLCDALKKRYEYARKIGKKIEDFYDKD/AKIFADDNPLHIMPNSD<br>GQEDPCNPIVKSVRKEAFSGVPIRNGVAGNSTIURVDFLKDKGKYCI<br>PVYAWNKTLPNRAVYSGKETDVALVDDSFWCFSIRQNELLKIKLK<br>GETIEGYNGFDRDRGSEFNILLHQRQDKHKGQGLIRKIKTAISITKY<br>DVLGNYYLSKPEKRLLEA<br>(N24)GUUAUAGUGGGAUACACUAAUAAAGUGAAAUCCGAAGGCU<br>CUGUUCUUGAACAUCCUUAUAAUAAACUCCUGCCAAUCCGUUG<br>GGAGUUU<br>(N24)GUUGUAGUCCUUGAAGAAAUCAACGUGUUGUACAAUAAAGG<br>UUUUGAAAGAUUACCGAACCCGCCUACUAGGUGAGGCUUU<br>U<br>MRDLSYRIGLDIGISIGWAVVSSETEHDIPARIENFGTRIFDSGEDPKTR<br>ESLCQARRADRGVRRLERRRAFRKEMLNHQNIGLNNNTENDDDYES<br>CRDDVYLLKV/KGLDGKLEAAELFKLAHTCNHRYGKDFYEPEDDDDE<br>NEESGVNEKAANLFEKEFAAGKRTVSEYLVKYEYNGFVKFRNRSGS<br>DAPYMLIRRSLLKDEAEKIKKKQSEYPCLGGINAERTVSHFSQRDFED<br>GPGDPNDPHRRYHGFLETLGRCPYKDEKRGRTVTSDFAVNTLS<br>QVVFKEETGECRLDPKIANELYSYLLTNAGLTMTVEVKILKSHGYEL<br>KKSEKSDDKAISKAVKFLSIACKCVEEAGKSWELISEQDFDAANLSTL<br>HRIGELISKFTQPSRRVQEMKKAGIDGDLIKAFSGKKISGTSVSYKYM<br>TDSINAFSLGDIYGNFQANFIKENAAVKEERSYKLEPRIHDDPEVRDN<br>RVVPKAINETRKVVNAHDIYGSPEDIVIEVASLGKSVARIEETKRQR<br>ANEKENDRIKSEIAKLLSHDVQSVKTMIERYKLYNIQEGKCAYSLEPL<br>GDLKDVVENVKVYEDHIVPFSLLDNLNKKALVFTRENQTKGQRT<br>PLMYLSEKAKEFLAFSNHLFSKTKTGISKTKEYLKLITYGEAAAEK<br>LNAWKSRLNDTRYITTKYIAGLFQDFKQIFAGDKKHQHVFTVKGSYTKQF |
| MG73-1 sgRNA | 11714 | MG73-1 sgRNA  | ヌクレオチド<br>(RNA) | 未知 | (N24)GUUAUAGUGGGAUACACUAAUAAAGUGAAAUCCGAAGGCU<br>CUGUUCUUGAACAUCCUUAUAAUAAACUCCUGCCAAUCCGUUG<br>GGAGUUU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| MG89-2 sgRNA | 11715 | MG89-2 sgRNA  | ヌクレオチド<br>(RNA) | 未知 | (N24)GUUGUAGUCCUUGAAGAAAUCAACGUGUUGUACAAUAAAGG<br>UUUUGAAAGAUUACCGAACCCGCCUACUAGGUGAGGCUUU<br>U                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| MG99 エプエクター  | 11716 | MG99-1 エプエクター | タンパク<br>質       | 未知 | MRDLSYRIGLDIGISIGWAVVSSETEHDIPARIENFGTRIFDSGEDPKTR<br>ESLCQARRADRGVRRLERRRAFRKEMLNHQNIGLNNNTENDDDYES<br>CRDDVYLLKV/KGLDGKLEAAELFKLAHTCNHRYGKDFYEPEDDDDE<br>NEESGVNEKAANLFEKEFAAGKRTVSEYLVKYEYNGFVKFRNRSGS<br>DAPYMLIRRSLLKDEAEKIKKKQSEYPCLGGINAERTVSHFSQRDFED<br>GPGDPNDPHRRYHGFLETLGRCPYKDEKRGRTVTSDFAVNTLS<br>QVVFKEETGECRLDPKIANELYSYLLTNAGLTMTVEVKILKSHGYEL<br>KKSEKSDDKAISKAVKFLSIACKCVEEAGKSWELISEQDFDAANLSTL<br>HRIGELISKFTQPSRRVQEMKKAGIDGDLIKAFSGKKISGTSVSYKYM<br>TDSINAFSLGDIYGNFQANFIKENAAVKEERSYKLEPRIHDDPEVRDN<br>RVVPKAINETRKVVNAHDIYGSPEDIVIEVASLGKSVARIEETKRQR<br>ANEKENDRIKSEIAKLLSHDVQSVKTMIERYKLYNIQEGKCAYSLEPL<br>GDLKDVVENVKVYEDHIVPFSLLDNLNKKALVFTRENQTKGQRT<br>PLMYLSEKAKEFLAFSNHLFSKTKTGISKTKEYLKLITYGEAAAEK<br>LNAWKSRLNDTRYITTKYIAGLFQDFKQIFAGDKKHQHVFTVKGSYTKQF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

【 0 6 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 5】

| カテゴリー        | 配列番号  | 説明             | タイプ             | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|-------|----------------|-----------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |       |                |                 |    | RREWFRCETWGWCKDEKDRRTTYLNHALDALVAANLTKAYIEIGSDAIKLS<br>QYRAHRYQITEEYESYLDKCVKKMSKYGFSEGYTKKLSKPERIPSE<br>VPRLKEEVAVRFNDSSEAFDKGVSKLYSAEAFDPPIPHITSHKQNKK<br>FKGIADSNPIRVEIDGAEIHKIRRIDIKLSAKKLKDLTYTGDVSLREEL<br>AAMLGKPESTYVGDLSKESGKEFFLSKSCAVIRKVSVDGIVSNYYR<br>KEIKDQYSTLGMILKYCYEVYKDAKGRTRYGRFYDVVKKNKKLY<br>OKAESYPEDYASHVMYLTGDFVRITDKKGLKFEFGFYQAVKNINSSI<br>LAFSPVNLANTVIKGISLTDNIEKYVVDILGRIGGKIRCSEPLQSTAEKK<br>SL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG14 sgRNA   | 11717 | MG14-241 sgRNA | ヌクレオチド<br>(RNA) | 未知 | N(20)GUCUUGCCGGAACGGCUAGACAAAGGGAUCCGUUUUACGGG<br>AUUACCCGCAAGGUAAGCCCGUCACACCCUUGGUGCGCGCGGC<br>GAUCCUUU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| MG16 エフェクター  | 11718 | MG16-1 エフェクター  | タンパク質           | 未知 | MIKNILGLDLGVCSIGWALIQTEDDQPKQIUGCMSRIVPLTKDDSDQFT<br>KGQAIKNAERTARRTKRGYDRYQLRRALLTQVLRQNGMLPECMD<br>ENMIDLWKLSDAATECKQLTLQQIGRVLYHINQKRGYKHAKSDDNG<br>DSKQTKVVEAVNLRYKEIQEKNTVGOHFYAEELNSKVESGNGPYTF<br>RIKDKVFPRAAYAEFDQIMGVQKEYYPNVLTDELETLRNRIIFYORPL<br>KSKHLYGLCEFEMRPYKDKGVYGGPKCAPRTSPLAQLCAMWET<br>VNNITLTNRNNELEISNEQRQLVQFLCTHETLKLTLKYKILGITKCD<br>GWYGGAIGKGIKGNVTLNQLRKALDGKYSQWLEMPERIDVDRNT<br>AEFWAVSPKVEETPLQLWHAVYSLQNVEELTKLQNRFSITDPQVI<br>DALCKIDFVKPGYANKSHKFIIRLLPYLMEGMYSACACIQIHNS<br>MTKAREARPLAERIELLQNALRQPVIEKILNQMINLVNRLQQEYGP<br>DEARVELARELKQSRERKDAFRNKNKEKRNKEISALISEQGIKPSRS<br>RIQYKMWEESEHRCMYCGKVVNLSEFLNGADVEIEHIPRSHLFDPSF<br>SNKYCACRDCNREKDNMTAMDYMASKPEGEFAYKQRVDEAFNAHR<br>ISKTRDHLLWRRADIPQDFIDRLRSQYATKAVEILQQGIRQVWTS<br>GGGVTDFLRHQWGYDEILITLNLPRYQVEDLTEMVHYEHAGQEH<br>ERIKNWSKRIDIRHHAIDALTVALTRQSYIQRNLTEASHIEHMEKLV<br>KEANTPYKEKKSLEKWWALQPHFSVEEVTQVQDGLYSFRAGKRVTT<br>PARRAVYHGKRTIVQRGIQPRGALTEDITYGKLGDKFVYKYALDH<br>PSMKPNIVDPTIRLLVENRITLALGKKDAFKTPLYSAEGMEIKSVRCYT<br>SLSEKGVVPIKYNEKNAIGFAKKGNNHIVAIYKDQSGQYQEMVVSF<br>WDAVERKLYGVPTVTINPKTVWDELEKELPQDFLEKLPKDNWQYVL<br>SMQENEMFVLGMEEDFNDAIDTQDYNLTNKHLYRVQKLSHADYTFR<br>FHTETKVDDKYDGVENGNTSMSLKALVRIRSENGLFTQFPHKVKIDI<br>MGRITKA |
| MG16-1 sgRNA | 11719 | MG16-1 sgRNA   | ヌクレオチド<br>(RNA) | 未知 | N(22)GUGUGUAUGGAAACAUAACACAAUAGGAUAUCCCGUUGUG<br>AAAACAUCAGGGUGGGACGCAAGUUCU/GCCCCUUU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

【 0 6 4 1 】

【表 3 1 - 6】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------|-------|---------------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG73 エプエクター | 11720 | MG73-1 エプエクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>MTKILGLDLGASVGYAVVNLEDEQKFDGGELTAGVRIFEAAENPKDG<br>ASLSAPRREARLRRLRRKTRIQURNLEFKYQILTEELNHLASPL<br>PSVWEIRTLSEYKQPLQIHARALHIAKRGRFSMRKSAEENYETG<br>QLLQGLSLQNLKQSGRQJIGEFYHLPQSEPRKSKAGSYNHSIARSM<br>LEEVRILIEKQRTYNTALSSEFEQEFRAIFDQQLPKSPSGKCTFLP<br>DEDRAPQOAYTAEFLAALSKINIRIVSQGTSRALSDAQIALDLCE<br>KENNFAQLRKLLEQENEFNISIYIPRAKQNTDYQPEKKTAVYKMT<br>GYHALRKALKDKHPLWTTYNMNPNGGLDQJAVVLAATFKSDKEIJNAL<br>EKLQFSELEAVKSLFSFGMHLSLKAMRNINPFLLEHTYDKACELA<br>GYNFAAKRNAGLTKLPPLTEENFISITSPVKRSIAQTRKVVNALNRK<br>YGPEDAVIHIELAREMGRNWAQRKELTQOQKENQEERDLIKAQEGEL<br>FPKNSLDIKKIRLWKEQGGCYTSNQYIKPEQILEEGYCVQDHIIPYSRS<br>FDNTLSNQVLCLTKENQDKRNDIPDYFORQDWDWSFVTLVNASPTM<br>RPKKQKLLRTELSEEDLAGCFKDRNLNDTRFSSFVRKYLLQNLQLTN<br>KYKQGYFCRNGKITADLRNMWGLSKIREQDDKHHDALDAVLACCNA<br>MMQOISTQYTHNKETAALKKPLFPWPWKEFRDVENALLSIVSRPP<br>RKKTGAFHKETIYSAKHLARGFKTLKTIDINTLTAEKLAQRDLKIKY<br>YGVERNKKLYDAIEQALLARTDAKQPLKVYLGAQTPYVKIKLMEG<br>NKGVPVLKGTAVAEENGAMPRVDVFKNGTVFLVPYVITDFTKEKPLI<br>SIPDNQPMVDVDRFSLYKDDYVQIKNKTGETFEGYFKQYNAQTGQIY<br>LETHDRSDSYTVSGKPASEKFKSKSTFVDFTKYQIDILGNQIRVEKEY<br>TGITRKNKGFGG |
| MG73 エプエクター | 11721 | MG73-2 エプエクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MNKILGIDMGIASLGYAVVNIDDENFVNGDILASGVRIEDVAESPDCSSL<br>AAPRAARSYRRILRRKVMRIKAUKQLFDENLLSPQELDLSSKQDFKT<br>LYQATPEGQPIPSVWEIRARALDNPCSLVDICRALLHIAKRGRFSMRK<br>SEKLTGEAGKLLKGVVEEMOKKLOESNFTIGELLFHLPAPEKRNKD<br>QSPDPGCTLEPTEPRAPKNAYTAELFAALCKINHIYLEDGQSHALSA<br>AQRALALEKCFSTQKTNYKQLRELFPNDIKFNISYTAAPAKKKKKK<br>EEAQSPQAVQAPQEDYDAEKNTTLNMGHFAHKKALKSSPLWAEYQ<br>TNPNGLDKIAEVLRSYKSDGEIRQHILTALGLPAEAVEKLNQVNFSGFM<br>NLSLVAMNKIIPFLKEGFRYDVACKKAGYNFQAPQONKGLSKLPPLTE<br>EDNHTTSPVAKRSLAQARKVINALKKYGFDBAVHIEVAREIGKSFKE<br>RKEIEAEQKALIAEERARLKEVGIDGHPQTEIDLKKRLWKEQDGRG<br>MYSLOYIEPRKILEEGYCVQDHIIPYSLSFDNSLNNOVLCTSENQHKK<br>NOIPEYEFHSGKAQITWEDFEGYVNSLQIRMAKKHRLKQELTEDDL<br>QGFERNLSDTKLISRFMKNYLLANRLTGKYKQGVFCVNGKHTSL<br>RGFWRLQKIREDDGDKHHALDAIVACCTNRLMQYISTKYRQNRLEL<br>QRKEVAVPWPFPHFKHAEVNSLSLSIVSRPPKKVITGALHKNTFSNAK                                                                                                                                                                                                                                                              |

【 0 6 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 7】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|-------|---------------|-------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG74 エフェクター | 11722 | MG74-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | HIKKGKIKTLRTDIQKLTLDLKKQRELEVKYFGVERNKPLYDIETALN<br>NRPNDKTIQVQMPTKNGGFVPRHIKLISETSGPVLGGTALAENDS<br>MPRVDFLEDCQYVVVPPVTMDFAKGVLPVLAQPSGRMLMKENFVS<br>LYKDDVYNLYNKQGETWEGYFKQLNAQTQYLYESHIDRSAQYTVSGK<br>PSNQKKIASSTLKLJEKYQIDIFGGKHLVKKEKYIGIRKNKGFGG<br>MQVHDDVHGLDIGVSLGWALLFEDLQTGEQRLIQRQTPQGETTYA<br>LGVRLFHVPENAKTKELNVKRTMQRMRTTARRAQRMRVRALL<br>DSLGVPGVRDADAFHILGKGRGAQCDPWQLRREGLERLLEAREWAVV<br>LLHIAKHGRFSNSKTDRSQSDKEMGQVLQAVSNLQOEVEASGLTVG<br>ALLASRERRNRADHTGAPRYDLCMLRSLQENEVNDILFTRQRELGNPL<br>AGEEVCRYAELAFAPRPLAVSHMYGPCAFLEGERRAPRAFTAEFL<br>RYVQALCNMRLRQETGEEPTLSEEQRAACAVFGSVQSVTVYKKLRQV<br>IRLPAGCFRAGLSYGVTEKGNVQDPEKADVNNRTGKCCQCTACLRGI<br>LGDAYEALHEQRLDEADAARLAATGALSAPAAALLARGMAGRLTDA<br>VARIVSELNDLQIRAVLALLPLAAPRIALSQAAGEGKLGIFQGTARL<br>SLRAMEAILPHMLACGEYAAACELAGFDPRAAQKTDVTDIRNPVVLRV<br>FREVRQFSAICREFGFLPCRVHVELREVKGSGERNRISRGLERTIK<br>EKEAARKAVAQLLGKSPETVSAGEYQRYELWRQDQKCAYYMLWR<br>HAGGERAYGDAMPQCSIPDPWLADGVNAVQVDHILPRSRTEFDSFHN<br>LCLCCHAANQAQGGRTIPWEWLGAQAQQAWHDFEQWVQSLPLKGLK<br>KRNVLRLDINAQVQGRFHARNLTDGYYVARTLRWLEEEYARHDVP<br>NQDADGKTRRRFFARPQVYTDLRRHWGVQALKKIDGQSGDRHHIA<br>LDALLVACSEGMQRMVRAFQREENGPERLHPCPWQDFSAIVGRA<br>LGSVFSRVERGRTKGPLHEETLRAIREERQPDGETRRVLYERKAVAR<br>LTAADLDKIKDAARCPOVVAALRRWLDAGKPGDALPRSAIHGDIIRHVR<br>VCAGEFSSGVVLQRCGQAQASNGGMVRTDIYSRDGKFFYMPVYAKD<br>VADKRLPLRACVAAKAEKDWREMTADYRFLFSLTPDCYVLTENRKE<br>VKEGYFAGANRNTSAISLSLAHDKQNVIQGIGITTLKRPEKYRVDRFGR<br>LSLVREADPRGRS<br>PCT/US2022/041755 |
| MG86 エフェクター | 11723 | MG86-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | MKKILSFDLGIUSIGYSVLTDEAQAQVSLLDYGVSMFDKPTDKDGNK<br>KLLHAQALSTKLYKLRRKKNLALLFEKYALAKASKLLEQEKKNL<br>YMYKWQLRAKKVFEERLSIGEIFTLHYIAKHRYGKSLDSGDLLELC<br>VELGKIDVKKKKDEKKGKIKQALSTESLRKEYPKTVAQIHYEVEL<br>QKERPVFRNHDNRYNMRREHINDELTIRKQKEFGNFENIDSEVFVD<br>IIAADDQKESTNDMSLFGKCEYYYPEHVAHQYSLSDIFKMYQAVANI<br>TFNKEKIKTEQIRLATEDFLNKIKKGSVKELKYKDYRKILKLDSEV<br>KFNKEDSYQRAGKKVEITTKTFHFVDNLKIDKSEFEDFNADSEYVL<br>MREIFDVHKEKSPRIYEQLSKYSSAEVHIDLRYKKGSSLSISSYAMA<br>KFLPYFEEGMITDAIKEKLDLGRKEDYSYKKGKIKYLIHISTYEKDDDL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

【 0 6 4 3 】

【表 3 1 - 8】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------|-------|---------------|-------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| MG86 エフェクター | 11724 | MG86-2 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>EINNHPVKYVYSAVLVVVKHLLHAKHGTFDEIKVESTRELSLNDKVKKE<br>IDKANKAREKEIEKISNDVYQKLAKEYGKNIHKYARKILMWEAQERED<br>VYSGKSIGIDDDHFSNRVDVHHIVPQSLGGLYVQHNLVLVHRDENLQKSN<br>QLPMNYTDDKEAYINRVEHLFSEHKINWKKRNLLASNDEYKDFEES<br>KDLRATSYEALTANILKRYYPFIDEKKSVDGSVRHIQGRATANIRKV<br>LGVTKSRESNHHGVDAALLIGVTFPSWLQKLSNIFRNFSGKIDDEARK<br>NIKKALPYIDGVEVKDVIYKEJQKYNYSYGEDSIFYKDIWKGAKTVNFW<br>VSKPMSKVHKDTIYADKNGGIFTVRESIAKFINLKITPTTPEDFMK<br>KFHKEILEKMYLYKTNSNDVICVQQRAEEJELLWSEFLDVKNKE<br>EMQEAKANLESVHRELFNDNGNVVRKVYQTNLTGPKVRGGLAT<br>KEQFIGRAFKKKKLEKYKRIDVSNFEKIKKSNDSGSKYKNDIVFV<br>FDEEKVGGKIVSFLEDKKMAAFSPKYPANIQAPESFLTIFKCKANS<br>HKQVSYGKAKGIKLVKDILGNIESYQVLGNKSKLLDEIKSIVSH<br>MG86-2 エフェクター<br>MKKILSLDLGTSIGYSVIEFGNDRYSLIDYGVSMFDKATDKDGNSSK<br>LLHSASTSTSKLYDLRKRKKDLAQLFIHFGLDKNLSLSEKQNIYK<br>NKWYLRCHKAFAKEKLNINELFTIFYTLAKIIRGYKSLSSDLLELCEK<br>LNPLETKTKKKDDERGGKIKKALKTIEELKQNSTKTVAQIHYEELKKENP<br>TFRNHDNYNMYMIRREYIDQEIEKIKTQKDFGLFDDKFDIDNFEKLDI<br>ITYQNPSTNDMRLFGNCEYYEDEKAHQYSVSDIFKMYESVNTFT<br>KPSIKITKEQINKIADDDFTKIKKCKNIADIKYKDIRKILALSDDTKIFNK<br>DDSYISGKKVEHTHIKFHFVNNLSKFDNSFIVENLSLENLKEIFEVLQ<br>FEKDPATAYEKLKDKIEDKQTIINLJKHKSGNSLNSAKAMVEFIPYFKD<br>GLTTDKIKELELNRCEDSYKPYKGIKYLNIHQFEQDDNLDINNHPVK<br>YVVSATLRV/KYLVHVCCTFDEIRVESTRELSQNEETKKAIEKANKELE<br>KQINDIVQNKYQNLQAQHYGKNLQKYARKILLYEAQNRRIYTGEGIE<br>FEDFTKKVDIDHIVPQSVGGLSVKHNLVLFVFRDTNIQKSNQLPMPVVK<br>DKQDFINRVEHLFSEHKINWKKRNLLATNLDEIYKDTFESKSLRATSY<br>IEALTAAQILKRYYPFKDKEQENGKAVSIQGRATSNIRKILKVKTKTR<br>EIHDDDEVKYLEPKELVELJEKNYNDGENSIFYKDIWKGKISYVFWYSK<br>DTNHHADAILGLTNQSWLQKLSNTFRENGKIDEEARANKKDMPIF<br>KPMVSKIHKDTIYSKKDDGIYTVRENIHIFINLKITPKTSSKKKFEFEFN<br>KKILNKMYLFTNPKDAVCKAIKRRANDIKTLDSFIDIDTKDKEAMNN<br>AKTKLDELJHKDIPDNNNGKPIRKIKFYQNLGTGFDVRRGLATKEKTEIG<br>FKAQINGKLNRYTRIDVANIDKIKKENDSFKVYKNDLYFFIYTDGTNK<br>GGKIVSFLEDKRIAAFSNPRFSSIGFQPHFVTFENGKANSKHQHSLNK<br>AIGIKLNLDLGNISYQKIGSCSELELFIKKVYIKD<br>MEKYIIGLDLGINNVGWSVVDQAQTNKIKYLVGVKQFEASDSAKDRRTQR<br>NTRRLKRRRETRKTDILKILSNINFPNNLTIDTMLIETRCKGNEQISKQ<br>DITNILCYMATHRGYPFGDEEVSFVDLDGKYPCEYYEYMEFKSSTNNK |
| MG87 エフェクター | 11725 | MG87-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>AIGIKLNLDLGNISYQKIGSCSELELFIKKVYIKD<br>MEKYIIGLDLGINNVGWSVVDQAQTNKIKYLVGVKQFEASDSAKDRRTQR<br>NTRRLKRRRETRKTDILKILSNINFPNNLTIDTMLIETRCKGNEQISKQ<br>DITNILCYMATHRGYPFGDEEVSFVDLDGKYPCEYYEYMEFKSSTNNK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

【 0 6 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 9】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------|-------|---------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG87 エプセクター | 11726 | MG87-2 エプセクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>YRALNTVKNENINEVKKMILETQKYYPEITNETIENIVTTLQKRRK<br>FWEGPSINALTDYGRFKTPEDVVEYLDKKKENPEYKIFEDLIGKCS<br>VIPNEKVSQINFYAEKFNLLNDFINSEKSEELNNKKDDFETQVTKYK<br>LRESGLNKVFDYCMKSDTLTIKGLFKDLFATTIDNISGYRQDGHDPNK<br>PEMSTMTNFRSIRKTFKECNANMDIFKDPENTIDYNEIINYMMMLVPGQV<br>ELNNMLSTIMPLSENDKEALKVFKSKKTNLKYHSLCEKILIRACNDML<br>SLQKNYMQVYKLDYGRKSRKEFYKRYEESNKGEKLMNPTFIDDISS<br>PQVKTLRQSKVINEHNEKSLPDVIVVESTKDTLSEKMKRVYIDIN<br>KKQKALHDKAKITLSIGYSEKDISKIEKLMLEYEDGLCPYCANNQI<br>TLKYLINGSDEIEHILPRSNFDDSFDRNRTVSCANCNNKNQTPLELK<br>GNEKSEFIERIKSNKNESEKNEFAGDISKYRTRFRNRLRTAYAT<br>KEMINQINFNLYESKNKDERIKTLSTPGQTHISIRKRYDLEKDRDTDI<br>PYHHAIDASILALLPTTKIGSKVVMFQNDNKKFFLENKDKMTEIGLEL<br>KYVDTSEKIEYDDYLADEFKNINDTSMFYSPYKKEPNKGLFNANMY<br>KVIKDDKYKIDQINDIYNLSDSKKLLPKLDDAKNETLICKLQHKKE<br>FYEKLNIVIKYSDSKNSPEFYQREINNLSEKEDFDYLGKGLKMSENA<br>PSVKRLRYTPISEPYLIDKKSINKKDGTYLAFDLSAQAGIEVYVYNETK<br>NCFAFVPIPSVCYNLKRKNRKHKLKYKYNELNLDYKVKYVITLYN<br>GNTIEVLKKNTHIKGVVSSYHKTNDKIVLKNGSYFTKSDLEFSIIDYNPI<br>GKSQKRLTKRIK |
|             |       |               |       |    | PCT/US2022/041755<br>MKKYTIGLDIGINNNGWAKYDLETAKKVIDKGVVRPKESSTAQDRRIIR<br>GSRRLKRRKQIRVERLAQLSNINFCTSRSEPELNNKRIKGLNESLSE<br>QETNIYWFAIHRCYIPFDEEKPEREVIHKEAEDEYPCQYIFDYKEYG<br>VYRGQCDLISLKDNLKELQILLTQQKYHSLTDEVIDNLIYHQSKEF<br>WEGPGASKENQLSPYGRYRTLEDEKYKADPTYHQYLYEMLIGKCEL<br>SIDKGFMDQVAPKCNFYAEFNFNDFNMSVKEPSQIDEERYNKITL<br>KGKFTEDTIEIKKEISTKKVSLDKLVKKILGLELKDIQYRIDKKYKP<br>EISQFEFYKYLKSKFDEKLNPSWLENDDKTYNQIVVILTVAPSTYAE<br>DMLKDRVKEVEFKKEEIDVLIDIKKKKNPDLKYHSLSERILKKAALDDIK<br>RHNCENFMQIMKRIEYKEMKEYFNQNYSTKTQSPYTTIEQYIDHIL<br>ANPQVKKTLRKAIKIINAIKEEKYPTIVIESATLSNKKERKKQIEEQ<br>KTEQNUNKEVKKLEDNNGYEATDKNMQLLNWKEINESCVCYGESISL<br>KEYLITEIEHILPKSKSMDSNNHTTCSCLKCNKEKNRTPYQYLTSKN<br>MYEGFNRMVNMQYDKMSQDKKSNLLFEGDIDDKYSIKFINRNLRTSYA<br>SVALVQELKKYNEVLGAKGYKINITSQGLTSKIRQYLKIKDKDRTY<br>LYHHVVDAMILASIPDTEIGKVLIEAQNDQSYWFKDKNKENKYKEEVY<br>NMLNNVWLSNRDQIQKFNQDCDNNPDNNKEGLIKRSEYVLKNPNVRQF<br>SQYTEYAKYIKQNDVYVYKISQIDNIYNLLIRKKDGSADKKKLLDELFD<br>LSNKKNTLCEKDKPKLYQKLAKNIYEKNSFSINPFYDESKYMYGLED         |

【 0 6 4 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 0】

| カテゴリ        | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------|-------|---------------|-------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | GDKFDCLQGIKRTDNSPLVILKRVLEKVTNPYIKNNITRRKNLYN<br>EFTINKPKDILGLDLGLKQVSTRIFYSYEDDKFELPICAISFVNGKLN<br>KKEKNYQITTYNRLIGNKNVYKEMGNVYGEVWGVYKNGGEYFEGRYK<br>GYHKTSNVLEYIYINGLDLTLSCATIGSSDLRIIYITDILGNRIHRLDTQKE<br>I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| MG87 エプエクター | 11727 | MG87-3 エプエクター | タンパク質 | 未知 | MTKNYSIGIDMGVNNIGWSILNNDTKKLENYGVRLFPITSNDAKERREV<br>RNTRRRLKRKETRLDDTLVLLKKYGFEDNTIEENLEKRVKGLNEKL<br>EKQDIVNLCYMIKIRGYIPFGDEEVLVNLNGKYPCEFYFYMYKNGG<br>KYRNRKMTVRITDNEKEIKILETSKYKNNINQDFINKYLNLTRRK<br>YWEGPGSINDLTPFGRFKTQEDVENYLEEKRNPSYKYEYEDLIKKC<br>DYELERCCCKLNIYELFNMYQDFINYSFKNEIELEKDCFYETKNGL<br>YKLNKKGLLMVKDYCMNNFKLYTDILKKLFTDKDNISGYRIDKDH<br>KPEFSTLNSYRKIMLEFTEKGFDTTWSDYNCYNEIMEKMTLTPGGVE<br>FIKIENKLVYPYKFNEEKSLFKELKEYFNKKTLLSYGSLSQILQKAI<br>NDMLDLEKNFMQVSRIDYKARENFIFIKYKKTNNKLEINASFVDDH<br>ASPQVKSLRQAUKIINAIEKEGCLPVSAIESITKELNSDKKKKEIEKEQ<br>KIQENLRKQASNYLSTVFGDSSVTETNLKVMILNENETNGHCAYCNKPL<br>SINDIFADNIQVDHILPISKSFNSDFNNKISCKKCNDDKKNNTPYQFLKN<br>KNYFEFEKRVLENKNSIDYKKNLKYKDDLDKYKTRFNRNRLDTAY<br>ATTELINQIEJFNLYLEHDKKRINTLSVPGQITSSIRNRYVKNEKTSLE<br>KNRDAGVTHHAYDASIVSVSDTHIGQIMLKAQNDKEYWIKNKSNDYDD<br>IVKYLINLRIDDITINQIEKINNENIKVSKQVSKNPQGLANSNIVMIKK<br>DNEQYIINQIDNIYTFDFKDDENKKLFEKLNEENNEFTLLCYDNDKNT<br>FNYIKIYNEYKNEKGNPFVNYLIDKGEIPDGSFSDYDITGIRMYTKKG<br>NGPIKRLRYYSKKNDLYILNKKNNKKNKDSNYLALDSLKQFCVKYVVD<br>NDKKFFVFLPIYITSLDPKTKKVNENDEFYKLFYKNKYIGKNVYTFADI<br>YNGNKEITKKDGTIVSGYYSTFNKANKLILNNGDITFTLSDKKISIHHT<br>DILGNEKKG |
| MG88 エプエクター | 11728 | MG88-1 エプエクター | タンパク質 | 未知 | MKYKIGLDLSTSLGWAUVVELNEADQITSLVDMGVRIFFPDGRDAKSH<br>KPINVIRREIRQMRRRGDRVLLRKKRVQLJHKYGLDFDISADIKLED<br>PYVLARAVSDKLSSAELGRVLFHLALRRGFSKNRKTETRGDSGGKLLK<br>KATLALHDAIGDKTLGEFQVDSKRYRFADQDGNKIKDQALYPTDRM<br>VLDEFNRICSVQNMSSDMRQQFEYAIFHQRPVLPPEIGTCMFELDQPR<br>AYKFEFVFRFRVLQINQLRIINNGEIKELTAEQREKLQDALLATFCG<br>VKRDKSGRPKITFAEVKKLLGLSRNTKFNLESEKRRKMDVDATAFAFA<br>ECELADEFWRACITDNVKSQVLAHLNDDLSDDLVDYLAHEYGISQDK<br>AEKLIQPPFEDGVANLSVCAMQKMLPLEQGHLYHIAKEAGYDHDAD<br>RGVIHLDLTPYYGDVMAIRPSLYQDKMGRYRTMNATVHIALNQLRAV<br>VNDLIARFDGEPYAINIEMGRDVSAGADERAEIEKQQAANKRENDRIAT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

【 0 6 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 1】

| WO 2023/028348 |       | PCT/US2022/041755 |    |
|----------------|-------|-------------------|----|
| カテゴリー          | 配列番号  | 説明                | 生物 |
| MG88 エプエクター    | 11729 | MG88-2 エプエクター     | 未知 |
|                | 11730 | MG88-3 エプエクター     | 未知 |

【 0 6 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 2】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------|-------|---------------|-------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | WO 2023/028348<br>YKLRSDAVDKETLTKQLGRIMYNLSLRGFKSNRKPTQKENDSDLKKA<br>TEKLKQELKGQTLGQYLWGKMKNNLDEKENKGKGVKNKIGKRVF<br>SNLFDGNKKKDGSVYPSREMYEDEFNRWSKQAEFHIDILDELKCKFY<br>NAIFQRPLKQQRGFCMFEDGELRIYKAHPLFQRFRALQTINQMEID<br>DKPLTEEQREALKKELFEFKTKNTKACTVSFSDIRTILGLKKGYNL<br>EKNDDENDGNTADTKTPEDKNKKDDKEYDNIYADKTAYLLSRP<br>ECFGEKWFEIPEDEQCSIVDILTDCVYNIEKKKYDEQEQNGKHILE<br>DDETRQLQEHYNLDDEQCNAINMAPIEGTGSLSQKAIEKILPYLEEG<br>QLYNDACKSAGYHHSDFDGMELGELPYGDLVKKSCVQDKDGNV<br>RIINISIVIALNQLRLVVELIKYGNPDFVAELARDLKMGTTELKN<br>LNNKQNSNKKENDKITKAKEANGPNNAKDREKFKLWELCQKRCVY<br>TGKQISATELFSDRVHVDHILPFSRTNNGFFNKVVCFGDANEDKGNST<br>PYAFKNGYQGSYEELDRYKKEIVAEAMKEKKMFKKKTVDKDKGK<br>KKVDIDEFSWRFKEDAMEKFEQEGLIARQLNDTKYMSRLAVQYLKH<br>ICKVYETDEEGKEHRKNCCYGLPTMTDFCRKGWGVNWLKDKSNK<br>EGYRSSHAHHAVDVAVACMTRGQLQKIASMANWIEHGGQCQDDK<br>LYLSILFKKCKKPFDTDRERIYELCDKMPISFKPKLKDPKQENSTVGA<br>LCEDTAYSLLEFDKGLNGVFKREDVGLVLDLPNIIDTQADKLKEY<br>VETEAENKFEKCEKNGIKIRCKSFADVSTYIPFKTEERDEYHKA<br>YEDWFIFEGRSPANETEEQKQERKEQELLKIVQQKALKAYKWVVG<br>GNNFCADVYQISPRDKVYTDKKEQGSWKVEVLSNYMATLNKGQALW<br>RKKHPTARLVMLKIDDMVMGENFTKEEAEQKLQOEIEKWEKSEM<br>KKYKDKLTEWEKTHEGKPKPKPKSINEHIEKCNKEKTSSTSLFR<br>VKKISSDGSVYIRPDTTKEESDKSVKLSASSYQKYKIRKVFVSPAGKL<br>VDNGFSDKWNDTKCN<br>PCT/US2022/041755<br>MSYVLGLDLGLASVGSWISVEFNGNRIDLGVRVFKKAETDKEGDPNLIR<br>RESLRSRRRLYRRAHRLSRLNLFSSGLHSHSKDEVLNKNVYENPWALR<br>TLGLNSVLTNNQLARVYHICKHRGFYWAASSADDGQADNGKIKKSLSS<br>NQLVMKEGKYKTVGQMFTEYPCORNKSGEYSKSLPTDLDKELRA<br>IFKAQGSFSPNIVTKDFINAVGCGDRKTGFLWEQRPALQGEDLLKMY<br>GHCRFEKDELRAPAANFYSEQLVWLTKINLNVYDEDSQERPLTREER<br>DLILNMPLEMKSDIKYSSLTSAFEKANLWKSQGFYKSVDEYQKTQKK<br>KNTAKSYDITKSSKNPKEDKVFYKSSHLHIEIRKALGSSLESEWEKIRTE<br>VLSGKYDRYNRIAYVLTVYKEDSDVIEQLSPYESRTLIEALLPVRFSGFV<br>ALSEKSLKKIIPHMVLGKRYDEACSEANYKHYKQNAEFKFKLYLPPL<br>FSGREPNGTLJFNEEIGDIPRNPVVLRVNQTRKVVNAVVKYKYGSPKSVH<br>IELARDLAKSRAERNEEASRHIKERDEFELFGSKCLNGTNL<br>LKRLYKEQDCSKMYSKEDIDHKLFEKGYVQIDHILPYRSYDSDSN<br>KVLVLINENQDKGNRIPFEYEAQHIGFSWYEFQWVWKSCKNLNQKK |
| MC89 エプエクター | 11731 | MC89-2 エプエクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

【 0 6 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 3】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------|-------|---------------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | WO 2023/028348<br>KRNLRCSLSKDAKKDFLERNLNDTRYACRFVKNYDLSFLCLSENSDNS<br>GCVVAGQLTAYLRNCWGLNKVREENDRHIALDATVIACCTRKIVQ<br>KVGAWSKREMSYNSSYVDPDSPVDEDEKLQKLYNVRTRKPPKP<br>WECRSEVESRVSFALEKLKELKQCSYTESELKNVTRFLYSRACE<br>KIGKALHGDIVYRQTSEMRKENYAVKKVSLKKLKYARIEAIVDADT<br>RNKNCALDKKRYEYARKIGKKIEDFVDKDIKFIADDNPLHMPNSD<br>QOEDPCNPVKSVRKEAFSGVPIRNGVAGNSTIURVDFKKDKGKYICI<br>PYAWNKTLPNRAYVSGKETDVALVDDSEWCTFSRQNELLKIKLK<br>GETIFGYNGFDRDRCSFNILLHQRQDGDKDIHQGLIRKGIKTAISTIKY<br>DVLGNYLSKPEKRIELA<br>MDLFLGLDLGIASVGSVVDNENKRVLDLGVRAFKAAETEDKGKSLNL<br>VRRISLRRIYRRANRLNSLNYLJKSLSSKDEILNNEHHENPWNL<br>RVKGLDGVLSNNQLARIYHICKHRGFYWSAAETEDTEKGKIKKCL<br>AQNSALTNHFRITGETILNKYPDAQNKADETKTSISRVLNNEELKK<br>ILTVQKEVFHNPLLTDDFFKAILGTGDKKSGFLWKQKPLQGEOLKK<br>MVGHCREFEKDELSPKANYFAERHIVWTKLLNLRVSEDCEDRALTV<br>EESIVINKIYEOKSDIRYSSTTAFVKSQIWPKNHQYKYGKLNQDQTS<br>SKKKVEDTASTSEDSTDTKTKAKTNPESKIFYKSSCYQNKDAYMSN<br>SLEQWNLSTQISQGNRYDRYNRIAYILSIYKDDDEVKKHLLDCGEKSE<br>VAFALLKIRFNGFSALSEKALKKIVPIMEQGRFDVACSEAGYAHYKQ<br>SQDSKEKRYLPPLFSGREPNGTLINSELDLPRNPVVMRVINQTRKV<br>VNALVKKYGSPKSVHIELARDLSKTEERIDIQKQKEIKERQKEQEE<br>FDRIFGVGIRSGKNLEKYSLYKQDDCKSIYSGETIDLGRLFEQGYVEVD<br>HVLPSRSFNDSDQNKVVLTKENQNKGNMLPYEFMSHNLWNQFE<br>ARVLSNKKLRNKNRCLLKKSLNRNSKKEFLDRNLNDRYACRFVKN<br>FIDKYLRLSDKADKSGCVVSGQLTAYLRKHGWLKNRSENDRHIAV<br>DATVACCSRMVQLIGYWSKIKERQYKDSQSDPDLESDEELLKK<br>SIGSQKLYFPYPVYKFRKELNLRVSSDIELKNELSLFSYTEEDISKV<br>KTLFVSRAIQKIGRGALHADTVRSQTEEMNEKVAVSRLKSELSDYDR<br>ISKIVDSDRNKNLNCALKRREAYCKSNNEISKLKAKDSAKIFTTN<br>PMHMPNSNGEEDPLNPVVRIVRVKETFSGVPIRHGIACNGDFRVDFE<br>KEGKYLVPYIAIAKELPNRACVAKKHESEWTVIBDTYQWCFSTQYD<br>LIKIELKKETFGYFNGFDRATGAVNILLHDKRSTEKYKKGLIRSIGLKT<br>KSVTKYRVLDLGNYYLAGAEKRIELA<br>MRKKIRYVIGLDIGIASVGWAALLDDENDNVCGIVRAGVHTFDEAVVG<br>QSKITGAAYRRGYRSGRRSRRKVNRIQRYKNLLQRLNISKKDLLEYF<br>SGAVENIYVLRCAAIQNEPAYILNKKELAQLLIYAKHIRGYKSNYSVEQ<br>KTDDSKKVLALSSENKKYMLEKGYQTAGEMLYRDEKFRKRYGSSEE<br>CELLLYRNSGDDYSIHSISRELLVEYHVIFARQRELGNKLTKELEDQF<br>PCT/US2022/041755 |
| MG89 エフェクター | 11732 | MG89-3 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| MG94 エフェクター | 11733 | MG94-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

【表 3 1 - 1 4】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 箇列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-------------|-------|---------------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | <p>WO 2023/028348</p> <p>VEIMSQRNYYDESGEGSPVGGNLIKEMVGECTFEKGEKACKASVTS<br/> ERFVLEKLNIHQKNGDVRLTEERDAUHLKAYKNKDVKYKALR<br/> TILKLNPDERFGLTYSRGDIENSTEKSVFVSLEYWYEJKKVLGLFYD<br/> DLNDEETQQLDSIGTILTCYKSDDLRRRKFEQLJHLEQEKIEHLALNY<br/> TKFQNLSEKAMKINIMPELEKGLSYTEACSNAGYCDKTEGKNKYISK<br/> ELLNNTLDSIMNPVYKRAVRRTRILNELIKQYGSPEVHEVMARDLTH<br/> SQTVTNKMKKRQDENKAKEEAKRFICENFGKTEAQVSGKDILRYRL<br/> WKSQNDIIVSNTMHPVSDILDYKYEYDHIIPYSCSFNDSFNKNMLYRK<br/> KDNQDKKNTIPEYIGSDEKKWEAFATCANTYVMNYGKRKNMLTKY<br/> PASNTGEWMSRNLNDTRYTTKVVDLIRKHLKFEAYVDQKRKKHYP<br/> NGGITAKLRYEWGLEKDRKSDKHAQDAVVIACCTDGMHQRLSRQY<br/> MLQEIGV'TWKNHKLVDRTGEVEETNLPWECFREVEVEMFADSP<br/> DYIEKAKKNGYKGEAPPIFVSRPQKKTGKINEDTLRSVRIDSKGA<br/> RFVNTKLODLKLEVYDGKKQIKDYRYPEDDKLLYDKLLERLVKND<br/> AKVVEAFEPYKPKKDGSDGPIVRSVTKYTKVKNQVLYGVGAERGG<br/> IVRCDFVKRKDEYYAVVYVYRDLYGNLPNNAHFDEMKKGEFEFSL<br/> YKDDLIRFYKDGKEQYAYYKYNANNSQITTYTEHDTSKETKCTTIRILD<br/> KFQKMNVDLGNYSDDKEREWN*</p>                                                                                                                                                                                              |
| MG16 エプエクター | 11734 | MG16-3 エプエクター | タンパク質 | 未知 | <p>PCT/US2022/041755</p> <p>MATKKILGLDLGNTSIGWALIEEDSNPKSILAMGSRIVPLSTDSTQFA<br/> KGOATKNADRTQKRTARKGLNRYQMRRAML/TEELRRHGM/LPERTD<br/> ENIMDLWRLSDAATDGKQLSLPQIGRYLYHINQKRGYKHKADNSA<br/> NTKQTKYVEAVNQRYRDIQACHQITIGQYFYEQLSSAVQIPSGSYTY<br/> RIKDKVLPREAYIAEFDQIMKVQRYFYPVLTDELVDTLNRNHIIFYQRP<br/> LKSKHLVSLCEFEKRPKREDGQIVYSGPKCAPRTSPLAQFCTVWEA<br/> VNNLTNRQNETEETQEQRVAMADELNQHDKMGYKDIQKILGISPK<br/> DGWWAGKAIGKGLGNTTFTQLREALGNLPNAEHLKMLKMSVDA<br/> VDTTIGELIRQVSPQVEEPLFRLWHLVYSLQNEDELKALRKQFGHD<br/> DEEVLDKLCKIDFVKPGYANKSHKFKIRKLLPYLMGYQYHEACAHGV<br/> NHSDSLTAEQNAARPLDQPLEKNELRQPVIEKILNQMINVFNALKA<br/> EYGDIDDVRIELARELKSSDEREAAFKRNNENRQNKIYENRREYGI<br/> QPSRSIQKYKMWEEFNHLCFCGKPNVYTDLAGAEVEIEHIIQPSVL<br/> FDDSYNKKVACACRACNQAGNLTAREFMEKISKEEYDSYLRRVDDAF<br/> NAHRISKTKRDHLLWRKEDIPQDFIDRQLLSQYIAKKAAILRQGYR<br/> NVYATSGSVTDFLRHQWGYDEJLHRLNLPYQQVEGLTETDVTYDHC<br/> QEHQERIKGWTKRLDHRHDAIDALTLTQQSVIQRNLNLSNREQ<br/> MFDELGKRTDTPETKRSLEKWWVDAQPHFSVQEVTDKVDGILVSFR<br/> AGKRAATPAKRAVYQNGKRHIVQITGLQVPRGALSEEIVYKGLGNKY<br/> VVYPLGHQSMKMDIIVDPTIREIVTRLNFAFGKAKDAFAEPLYSDA<br/> AHQMQIKTVRCYITGLQDKAVVPVRENAQGEVPGVFKMGNHHIAIYR</p> |

【 0 6 5 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 5】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------|-------|---------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | WO 2023/028348<br>DAKQYQESVVSFWQAVRERYGIPVVEQPIEVWDKLNSDNPQDF<br>LETLPHDDWQFVVSLSQNNEMFILCDDADFEAAEMEQKYRTLNKYL<br>YRVQKISSKEYCFYHITSVDDKYDGVINKSISMELQKLKRLTSISAFF<br>SQPHKVRVNLGGEVSAL<br>MNSTRTPVLVSFDIGVASVSWAEVVDPPANNLQAGVVTFPSDDVLNS<br>ERAGHRRARNIAARRNRVQRLLKLSVGAGFVTAEEIEITLDRMERKS<br>APEWRHCPWFLAARVLGESPESTLTGLQHLVLRWYAHNRGYAPPSW<br>GLFDEADGEQEDEFKVRNAEKAMHEFGADTMAQTWCALDADPTA<br>GRWPEPRHWAKGENMAFPRERVQAEVTRLLVAHVGLPGVTSDFVR<br>CLIDWEHHPKIRSWLQCADPRTCKLRYALPKRYEGGLFGQHPR<br>FDNKIIPWCPFTLKEDTNSGKSGRNVPKHSRAFLDFKVAAMRLNDLA<br>LSELGESGRLSAGQRMVTLFKRIEGYGDVTVRQFADLVAEVCAPKPD<br>LTTRIPEREGSDRPFELPERKALJAILTGGSLPSWPLHISWDCTEDA<br>EAVLRPVTHGKPTSWADLJEQAKAPDVLLERLEFRLGKGKPSRSKK<br>AQPPDFEVLLRCIKHTTKAHGRARYCSDKLRAATDEALGGLDPRRAP<br>TTETSDAGCLYLNERQDILQDRPLPSKLTNNHLVRHLLIFRLLQD<br>LVNTYANGDRERIDAIVVEARDLNEYSGKNTKQVVALFQEKQRPEND<br>AAEFAQALIDDAQVYTPQEAQALATYANVRERFRLMREQNFCPTGR<br>HLSAEDIAKDRVDFEHIHPSRLKPTDSLDAVITYRANVQAKNRTAMR<br>FIKDMAGERLDADDAGWSYHTPQQFETAVNRMMPKGRINTAAKRSQ<br>ANRCDALVEDYEPREADFLOQDLTQTGYLMKYAVGEARKFFRSAPR<br>QPRFTHLEGRVTTFFKKAWRLTETLAPISPLFREYADPRTGRWQSTV<br>RPKAELERRFTQLHHALDALTLGLATALVPGIERKELRRALSRLQAQGD<br>DATLRSDPKLGELRWRTEDFEAAPLSGKLESARRALAEGRVVQ<br>HVPKARQGMKVDSNFFGFVDFETGRLRVROKMRSPTTIRREIKTV<br>KNGKNLHTLSLSDPKSWLGAPDHPRLRRKQLEHGLRTENDLANPKL<br>GNIRGMLPIRENWGIALTCKDGPRLDVIPYINVHVQWLEVLALENGGS<br>PVVLRKGHLVGFDAEKCPPEYCGAWMLLVGVDGRSGTTLLELRPWM<br>VAPRKGGTKESSAKQAIPASGYSEKCKASGVFLQRSADVFLKLGLR<br>PLDHDLTGIAAF<br>PCT/US2022/041755<br>HNTSGVYDLTVARTFIEEAHKLFAAQRFQGNAFATENIENIENYCELLS<br>QRHFSDCPGCGERTEKFLRGNCCTFEKDELRAFKACYTTEFFKLLQDIN<br>HLRIPEYRKSGNKQTRPLTPEERQKIDLCSSSIDFSKLKELKLAD<br>DEJFNRYGVDYKKKKSKKDAEEQPEQLTPEQORTKCEATKFTQM<br>QSYHEMRKALDKVAKGTISKFSHDKLDEIGELSLYKADDKRRERLEQ<br>IGLSNEEIEALLPLTFTKAGNLSLGAMRKLIPYLEQGLTYDKACEIVYG<br>DHRAQYKGERMPLLSFGKLKEEGALDSVNNPVVLRALAQITKVVNAH<br>RRYGSQAHHIELARDMKRNFADRDQIKSKOKDNWSENNRRREKVEEI<br>KGSVATGQDIVKMKLYEDQNGCYCLYSCKQLELHRLFEVGYAEVDHIV |
| MG2 エプエクター  | 11735 | MG2-4 エプエクター  | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| MG21 エプエクター | 11736 | MG21-2 エプエクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

【 0 6 5 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 6】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------|-------|---------------|-------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG22 エフェクター | 11737 | MG22-2 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>PYSKCFDDSYNNKVLVFSSNQRRGNRLPLEVMLAEGDEDEKLDYVTL<br>VEANIKTRKKQLKPCLETDQDITDQWKARNLTDQYITKAVADILRN<br>YLAFEEDSPFIKPVRSINGAVTDQVRKRLGLQKHREGLHHAMDA<br>AVIAVTTDGYINRISRYTQRREFGKRGCKDKQIGEKVEIERKQQA<br>PLYIDPETGEKLEQVFDHKYAPTEPAPWKEFTKELKARMAPNADEAI<br>RQLYLPSYSGSEIKPIFVSQMPDRKISGQAAETIRSARIDYDESGKERH<br>AVAKTPLSLKLDKDGIDGYIMPSSDRLLYEELKNRLKJTKSGKTY<br>GNAEQAFKEPVYKPKKDGSGQPRYKVTWKPTTNSNVKVAAGGIKK<br>GDIVRVDFHITGCGKQGYFVPIYADTIKNTLPKHAVTNFKSSKVE<br>WKNDSSNFTSLYKGDLIHIELCADCRDKDSNNKIRKAKDMYVYVYDG<br>MKNILGLDLGINSIGVAWQSKVPQQTDPCSSSEYLMPDCAITRMAG<br>SRVLPMDGKMLSGFESGLAYSKTERITTYRMAARRVNERFQLRRLRN<br>RVLRILGFLPAHYEACLDRYGKDEKNVTIPWVPTADGKRKFLFYAS<br>FLEMKEFHEHPNLEKIPLDWTLYLRTKALQQAITEELAWVLHS<br>FNQKRGYNQSRDEVKDEDASQKEEYVKVSVSVVDSGEKKKGKTSYI<br>VTTESNLQFTTENAAPSWLDEREFVTTKLNPTGLPKMNQEGRIDC<br>TVRIPKEEDWELKKRTEALIAADSHMTVGEYIFHSLDNDPAKIKGAK<br>VGTIDRHFYKEELAILKQAAFHPELKDAAERYAECVSALYASNEHHR<br>NILSAWDMPLRIVNDHIFQRPLKSKSDIAECPFESRYFMDKEKLOK<br>QGJKCPTSHPHFQYRIWQFLSNLRLRREVRNGRYMTDVSAAHY<br>LTDKVKVELYEWLAGKANVKQKELLSKLRMSEKEFRWNVYEDNYP<br>CGETRSLSTRLLKAKLPLSLDSSDGSHTTEFELWHILYSVSLAEL<br>RKALRRFARKHIDFTAEQAEFVETVYCPFFKKDYGAYSDKALVKLL<br>SLMRIGKYWNADRIDTNTRRRIACLLDGEACDSISLRTREKVAERGLQ<br>QSIEQFQGLPQSLACVYVYDRHAEASEVVRWESPADLQQFTRQFKQYS<br>LRNPIVEQVYLETLRVVDLWEEIQDKDGGTIDEIHELMGRDLKNTAEQ<br>RARIIMRRNENEMTNFRKLLQELHDCQPDIEGIRPYSPSQEQLRLY<br>EETVWESESGKLGKGEASKDIPDDIKKIRDLKSPSKDKPIQSAIQRYRL<br>WLDQKYLSPYTGRIPLARLFTADYEIEHHPRSIFDSDSYANKVICESAV<br>NKLNNRNLGMQFIREMDGRVETVKLGEGETSILSYDGYVDLYNDLF<br>RNNPRKRNLLAEETEDFCHRQLSDTRYIARYIKGILSNIVRQRAADG<br>TLEQEATSKNLIVCTQITDRVKQDWDGLNDVWNHITPREFLRNMTG<br>SNDYGEWCCKEGRYFTIRVPLHLQIGFNKKRIDHRIHHAMDAIAIAC<br>VNRNVYNLNNAAAHAIDRMIDLRNMRICRPSGNGQTKKEIRSPWKNEFA<br>HDAECALQAITVSEKQNVRIITKATNTYEGVDASGKKVRCQTSDDHY<br>SIRKPLHKDITVYGEVVLVNVNQVPLKAKALLRVNRIVNGKLRKKIQEM<br>QSSGLTDKQIVDFMKTCADEPWSNFKKIEVRAYSNEEGQTRMAAI<br>RTAIDESFEKVGISTIDVSIQRILLNHLRECNQDSEEAESPEGIETMNRN<br>IVRLNGGKPHLPYKVRILGEAMGKKEAVGQRGNKKGKKEVITAKNTNL |

【 0 6 5 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 7】

| カテゴリ        | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------|-------|---------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG23 エフェクター | 11738 | MG23-2 エフェクター | タンパク質 | 未知 | <p>WO 2023/028348</p> <p>FFAVYANDEGKRSFETIDLHCALQMKGSSVAPPINENGDKLLFVLSP<br/> NDLVVYVSESELQHDHSEDLDLHVFKVVSFSENRCFCVPHSMSSPIAA<br/> GFENSPNKIEVVSRGLGFEQDKEVTSIKNICLPKIMDRLGHLHLVYKI<br/> MSEKIPYYIGLDMGNTSVGWAVTDENYKILRGKGMWGVRLFDEA<br/> QTAARITNRVSRRRQRREVARGLVKEYTADALNAVDPGFMVRLKE<br/> SKYWLEDKSEENQKFALFNDKDFDKEYTYVYPTFIHLRKELIESTE<br/> QHIDRLVYLAILNLFKRRGHFLNKSLESDGETMSMAEAYAAALDEAA<br/> ALEITLPMIDAKKLEVLQSGVSRKVFQDINETEFGFSKASEAREL<br/> VKLMCGLTGKMRNYGEELIDDDNKKLALFRSNDYEEKMNEVAELV<br/> GDEMRLLEAVKEVHDIALANILSGEQVLSVARYKQYNKHKEDLQQ<br/> KRVLRDYDKAAYKKMFRVMGKDNYSAYVGSVNYKEHKERNAGA<br/> KGDSERKAVEKVIDALPEEAQLDQDVIEIREKNEAFLPKQLTSAN<br/> GIIPNQVHLRELKRILENASGYLPFLNEIDESGLTVKERIAQLYEFQIPY<br/> YVGPLSKQNSKNWANRRPGEEKRILPWTFEQKIDVYNQAAEDFIKR<br/> MYRHCSYLDAAFTLPKQSLMYEYKMYVNLNENLRINGEKPTVLQKQQ<br/> IYNELFGKGRITQKALINYLKDEGIVEKDESEPHSGIDGDFKASLTFG<br/> KLRTVLKEEARKDSQEMMDQVFWATVYGGDKRFRARIEEHYSEIL<br/> DDHAIKQLLGMKFGNGWNLKSAFLEMEGASKEDGVYRSVIQALWET<br/> NDNLMEELGQRYTYKEELEKRVQTEKPELAEWTIDDLGMYLSFSVK<br/> RMVWQTLKIREITEVRGSAPSKIFVEMARDDAQTAKNKGKRTKSRK<br/> DFLECYKDDKAWKDELTSVDDGELRAKKLYLYLQMGRCMYSGEA<br/> IDLASMSGNTMYDIDHHPHFVKKDSLENLVYKKDKNAHKSNDY<br/> PLESEIRNKKQGFWKSLLDKGLITKTKFTRLIRSEDFSEELAGFINRQL<br/> VETRQGTAKITKILQQAFPPDDMEVFTKAGVAAKLHDFDLVKVRC<br/> VNDTHHAHDAYLNVAGNVYNNAKFTSNPLRFIKNEVKKGNASVIMDKI<br/> FFRDVKRGNKLVWQAPNNEEKTGTLAIVREQLARRTVLQTRRSYMA<br/> HGILSDATTYSKDTAKTESRPVKSSDERLSDVKYGGNTSIRKNTAYAL<br/> VEYTVKGTIRSLGVPIYLGNCSDKDKLLQVLEHLORENKKNQVE<br/> NYSVRMYPQRQSYLVKDYGYYYLGGATGSSVYLLDAMSVYLSKEDM<br/> GYVKKVEKAVAQQRVDECTKEGFEVLTREKNMDLYNKLVDKFSHG<br/> FIKKASILKTLLEGIDVSELNIEKQCGHMQIFAWTTTSQQNVNLTIDIG<br/> GVAHAGTLLSKKLSREALLEQSLTGLWSKTTDLITV</p> <p>PCT/US2022/041755</p> <p>MSADSLNYRIGVDVGDERSVGLAAIELDDDDGFFPLKKLAMVTFRIHDGK<br/> DPATGKTPKSRKETAGVARRTMRMRKKKKRLKDLKKLRLDGLGYFV<br/> PRDEPQTYEAWSSRARLAESRFPDPIERGEHLVRAVRHIMARHGW<br/> RNPWWSSQLEASQEPSETFGRILEAQHEWGERVSDNATILGMLGA<br/> LAANNILLRPRRYEHNPKTGKNAEKLNVRCQEPILLDKVQEDVLAEL<br/> LRRICKVQGIEDQYPELAHAFTQVRPVVPTERYGKDPQPMKIRASR<br/> ASLEFEQFRIRDVAVANLRIRVGCSERRPLTEEYEDRAYDYLMEYSDTTP</p> |
| MG3 エフェクター  | 11739 | MG3-3 エフェクター  | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

【 0 6 5 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 8】

| カテゴリー      | 配列番号  | 説明          | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------|-------|-------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MC3 エフェクター | 11740 | MG3-4エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>PTWGEVADELEIAENTLIAPVIDDVRLNVAFYDRSSAIVEAKLRKKTQA<br>RQWVDDDDANLILRSQJLLVSDATDDTARVAENSGLLLEVESWSDDEE<br>KQTLQDLKFDGSGRAAYSIDTLNKNAYMHEHRVGLHEARQNVFVGVSD<br>TWRPPDRRLDEPTGQPTVDRVLTIVRRFILDCERAWGRPKQIVVEHAR<br>TGLMPSQRAADVLEKELARNANERIRQELREGGIEAPNRADIRNSII<br>QDQESQCLYCGKEIGVLTAELDHIVPRAGGSSKRENLAAYCRACNAS<br>KGRPFVWAGPARLERTIQRLRELQAFKTKSKKRTLNAIRRLKQRE<br>EDEPERSLASTSYAATSIRERLEQHFNDDLPDGFAPVAVDVYGGSLT<br>RESRRAGIDKSMILRGQSDKNREFYRIHIAIDAAVMTLLNPSVAVTLE<br>QRRMLKQENDYSSPRGQHDNGWRDFIGRGEASQSKFLHWKKTAVVL<br>ADLISEAIEQDTPVYNPLRLPQNGSVHKDITVEAVLERIVGDSWTDK<br>QVSRIVDPNTYIAFLSLGRKKKELDADHQRVLSVAGVKLLADERVQIF<br>PEEAAASILTFRGVVKGIDSHHARLYGWKNQQRGDIQVGMILRVFGAEFP<br>WFMRESGVKDLRVPIPPQCSQSYRDLAATRKFIENGQATEFGWTQON<br>DEIESAEEYLATDKGDILSDFLGILPEIRWVKTGIEDNRRIRLRPLLS<br>EAPNMLNGRLLTQEEHDLIALVINKGVVVSTFLALPSTKIIRNNL<br>GIPRWGNGHILPISLDIQRAATQALEGRD<br>MSTDPKNYRIGVVDGDRSVGLAAEFDDAGFPIQKALVTFRHGGGLD<br>PTKNKTPVSRKKTIRGDARTMRNRRRQKRLDLDMLMTNLGYTVP<br>EGPEPETYEAWTSRALLASIKLANVDELNEHLVRAVRHMARHGWAN<br>PWWSIDRLNENASREPSETFEIILARARELFGKVPADPTLGMGLAAN<br>NEVLLRPDRGKKKKTGVVGTPLLVAKVRQEDQLAELRRICEIQGIEG<br>QYDALRSAIFTHKMAYVPTERVGKDPPLNPSKNRTIRASLEFEFRILDS<br>VANLRVTDSSRKRELTEAEYDVAVEFLMSYTANEPQPSWADVAEVIGV<br>PCNRLIAPVLEDVQQKTAFFDRSSAAFEKAMGKKTEARQWWESTDDD<br>QLRSLFISFLVATDDTEAAAEAGLPYLYMSWPAEEREVLSDIDFEKG<br>RVAYSQETLSKLSYEMHEYRVGLHEARKAVEGVDDTWRPPLDKLDEQ<br>TGQPTVDRVLTILRRFVLDCEQWGRPRAITVEHARTGLVGPAPQROI<br>LNEQKNRENNELIRGDLRKSQSVENPSRAEVRRLIVQEESQCLYCG<br>AVRTDITSELHIVPRAGGSSRRENMAAVCHYCNSKKKRTILFYDWA<br>GPVKIQETVDRVRQLEAFKDSKKAKMFKNQIRRLKQTEADVPIDERSI<br>ASTSYAAVAVRERLEQHNEGLAPDDKSRVLDVYAGAVTRESRRAG<br>GIDERILLRGERDKNRFVRIHIAIDAAVMTLLNRSVALTLEQRSOLRR<br>AFYELELDKLDKRDQLKPGEDWRNFTGLYEASQNKFSWKKAATVLDGD<br>LLAEAIEDDAIAYVSPILRPQNGSVHDDTINAVKKLTLSGAWPADAV<br>KRIVDPEIYLAMKDVLGKLELPEDSARSLSDGRYTEADDEVLFEPK<br>KAASILTFRGAAEIGNSIHARLYSWLTKKGELKFGMLRVYGAFFPWL<br>MRESGRDLVLIHPIHPGCSQSRFGMQDQGVKAVESGEAVEFGWITQDD<br>ELEFDPEDYIAHGDDDELNRLLRVMPERRWRVDFGYNAGTLRIRFALL |

【 0 6 5 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 1 9】

| カテゴリ        | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------|-------|---------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG4 エフェクター  | 11741 | MG4-2 エフェクター  | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>SAEQLPSELQKKVADKTLSDVELILRAVQRGLEVAISSFLPLESLKVR<br>RNNLGFPRWRNGNLPSTSEVRSSALRALGVEG<br>MLREPCNSVSKIMGQAKRRSYVLGLDIGTHSVGWALLKFRDGRPC<br>GVERAGYRIFEPGVEEVAFERGRAEPGQKRRQARLRRTERRARR<br>KAKLHLILQRAGLLPKGEADEILPALDRDILARHSAAWPGARDALPYW<br>LRSGALDHLRLEPHIEFGRALYHLGQRRGFLSNRRAPMRKNEEDGKVK<br>GISTLKEQMEKAGARTLGEFFAGLDPHQRIQRQRYTSREMYEQEF<br>WSAQAHHPAILTDDLKARVHHAVFHQRPLJNQSYLAGSCTLEPDRK<br>RTPWACLIAQRFMRMLQKLNTRVLPASGPSPERPLSDERQTVLTEDRK<br>KELKFDVYRKLLGLSADSSFNWESGEGEDRLVGNNTTNARLAKVFGKRW<br>WSLSPDRDQVVEEDVRSYKAEALARRGHEHWGLDEKAAAGELSKLSL<br>EDGYCRLSRQAIERLLPGMEKGTAYMELVRKLYPDRWAAGKPVDLLP<br>ALAEITDLMRNVPVRRCTELRKVNNAVVRHYGKPSAIRIELARDLRK<br>SAKQREQTWRNRNRNQDREAAAEKLLQEARIANPSRADVEKVLAE<br>ECGWHCPTYTGHGFGMADLFGPHFDVEHVPESRSLNSFLNKICE<br>ARENDRKRNIHPIYAYGADAEWDQILARVQSFRTASREKLRFQ<br>QHEVEDLDGVAQRELNDTRYASLLAVQYVGNLYGGAVDAGHVRVQ<br>AAKGGTTGYLRDMYGLGFLGEGRKRSDHRHHAVDVAIALTDPA<br>ALKSQAASDERRGGRVSFGAVALPVWDFIGDVQAAIEAINVSHRPSR<br>KVNGALHEETFYGPRGMDGDRPTGYVQRKPVVERLSAKEIPNIPPAV<br>REAVQAKLDEVGGTPAQAFKDPANHPVRKRGPVHKVRLRLNINPVQ<br>VSGATERHVLJGNSHHMEIEHVRDAKGGKKWTGRIVHRLEAKRRA<br>LGRETIVDRAVQAGRQFQFSLSPGDMIELTGEDGERKLIHVRSISEGRI<br>EYVDARDARKKADIRASGDWRKPAVGSLLRLJHCRRKVVVTPFEGRYA<br>ND |
| MG44 エフェクター | 11742 | MG44-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MEKFYLGADIGTNSVGIACITDENYELIRAKGKDCWAVRLFDESKTAET<br>RRNFRTRRRRLERRKQRIQSWLQALFAPVINDETFEIRLNNSQLPEDKD<br>EILQADKNALFGDEGYTDKNYHVEFPTIYHLREKLEGGKYDLKLYYL<br>TIIHIVKYRGHFLFEGATMEIIRDIKRLFENLNAVWEATYAEENVPHNL<br>AKSDEAKEILLDTKKGLRDKQIALEKLFQENTAMKESIKAMLGKIS<br>PETLFGEEYKDEKSFSEKMDDEAFDALQSTYGDNFECLNALSINVFV<br>AFEKLLCGHKNISSAMIAVYNKHAADLLSKFSRSPNDYNKIFKSTY<br>EKANYVNYIGYTKKGGEKKVAKCKSDDEFFAYMKKYLSSLDKIDG<br>ATRDKILGEIENGSLPKILHSDKGLFPROVNEAELKALASNMYKYYPE<br>TKELADKIPLFEYRIPYFVGLAGVNSWAVRKSGETTPWNIGEKIDLAA<br>SNEEFMRKMTSKCSYIFGEDVLPKCSIYQKFDVNLQNLKLRVNDRLT<br>VDLKKGFNELFLKYPKYSKKIKDYLRNGHFSPIDGTEITSGKDGFEF<br>KASMSYIQLKRILGDFVDKDLNENGGEVCENILWHITLNDKKIVYDLI<br>EKRYKNIPEIADSVKALKGLSFRNFGRLSKFLVDLYSADNETGELYNI                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

【 0 6 5 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 0】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------|-------|---------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |               |       |    | WO 2023/028348<br>LDVLYETNENLEINDEKYAFGLVDEANGVADSKITYEDIEKLYVSP<br>AVRRGIWQTVTMIIDEYVEAIGRTPDKIFEVETREDGVKGDAGRTPRK<br>RQLQEKYKNVSKTYADVISELGEDEKYSNMKLRQERLFLYFRQLGKCM<br>YSGQRIDLRLDTDTYDVYDHLPTFIKDDSLDNKLVLRSKNAEKADR<br>YPLPQGFSDQQDFWKMLLDKNLJAKTTYDRLTRTEPLGDNDYKDFINR<br>QKVITDQTVKAVAELMKRYPTAKIVYSKAKNVNDFKNKFDIFKCRET<br>NDLJHARDAYLVNVVGNVYDVTFSNPLDMFRKDGDMWRTYNLKLFL<br>TRDVKCAWDCSRIARIKSCIGSHTMAVTRYAYCNKGFEYNQTVYVKD<br>DAGYSSPRKSNGLSDTKKYGKYSQTAYFAIVSSLDKKDNRVKTIEA<br>VPVLVAYRLKNNPKAVEEYNSYLKSPVLPKIKNNQLVSYNGSLVYI<br>AGVTGRISVINATQLFTDNKMDEYVNGLLKLLDMDAKKMLVGDEP<br>RYVIKTRNKEKLVIDKEKNVLYGVLNKLCDKIYSGLSAFATFAK<br>NIENGKEKFIDLITVEQAKVLIQILMFRKRDILSDLTLIGGSSHSKIL<br>FNKKIDVNFIEHLSFAGLRVKNKV<br>MKNYYLGLDIGTNSVGYAVTDGGFNLLKYGPEPMWGSIVFEEGKQ<br>CSDRRMIHRTARRRLDRRQQRVHLTQEIFAKAISEVDERFFVRLKESAL<br>FREDTSGRDTYFFQDENYTDKEYHRDYPTHIHLKJELMEDTTPHIDVRL<br>VYLAVAWLMAHRGHFLSEVYKDNITELLDFDSIYGNLMELFTTPPWIC<br>SDKEEFKNILLHQTIKNKERKFWGLLYEKKPKTDEEDYINKEGMIR<br>LISGGTVEAGKLFNQKEFQEKISLSKSEEDFQLLLDEMDEESEYLI<br>RLRALYDWAALLVDSLHGSSISEAKVQDYAQHEADLMLKNFVRKYC<br>PNEYAAIFKNAEKENYASYVYNIPKGRKTEYKKTITQEEFCDYLKKK<br>LKDIQEEDEQEIYQDMMHRLTYTETMPKQVTDGNRVIPYQLYYDELK<br>KILENAENYLPFLKKVDEQGISNKTLLSIFEFRIPIYVVGPLCSASKYA<br>WLKKAEGKIYPWNFEKVLDQSEKAFINRMNCSYLPGETVLPQ<br>NSLLYCKFTVLNENNINGIPISVECKQEIYRLFEENKKYTVDKIKKY<br>LISNNYMEKEDV/LGGDITIKSLKPQHDKFLHLSKILNEKEVEQIECI<br>TYSEKSRVLRRLEREPKLSDEDRYLSKLKYSFGRLSREFFTHHG<br>ANKETGESFHIQALWDINDLMQLLSDRYTFKDSIEEQRQYVEHP<br>MTVESLLEMYVSNVAKRPIYRTLVDKIQSVCKAAPKIIYIEMARG<br>QEEGNNRKRKRDQILELYKNMDKGEVRELKQLEDCSDRELSEVLF<br>LYFMQLGRSMYSGKPIDIEKLTNAVVDHIYPQCRVKDDSLSNKVLV<br>LSEENRAKGDYKYPISAVIRQNMGMEMRWVYHIEKGLISDEKVRRLTRY<br>AFSNAEKMEFINQLVETRQSTKALTRIFRYFPETEIVFKAGLYSDFR<br>NEVLKCAKSRIVNDLHHAIDAYLVNAGEVYHARFTSKFFKIDQDEYS<br>VKTKAIFGNKYWNGKELVWDGEKDIARVKKILTKNSVHYTRYAFERK<br>GGLFDQOPLRAASGLIERKAGLDEKYGKYNKSTASYFLLYKYAEAG<br>KKPKQDYMFEVPIDLMSEFQIKSEYAKYVYRNAIAHIGKSRIVQEV<br>FPLGMIRKMKYVNTLLTLDGFEAILASKSNGKTLVFGSMMPFLVFNKK |
| MG46 エフェクター | 11743 | MG46-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

【 0 6 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 1】

| カテゴリー      | 配列番号  | 説明           | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------|-------|--------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |       |              |       |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG6 エフェクター | 11744 | MG6-3 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>EYIKRLESFSSKKQNNFLFVDEVYDKITKEENRELFLFLTNKVEEP<br>YCLIFGSQQLVLIHDKENEFENLLEQQVETLLNLSIFKTGRTIGCDL<br>KLLGGAGQAGIFTESKLSNWKKSYKDVRIVDISAAGLIRKTSQNLLE<br>LL<br>MKKVLGIDLGVASIGWGHETDEKENGRILKSGVRIFQGNQRAADA<br>PGESSNADRRNKRYSRRQDRRTRRKINLYVTLKKNGLAPNKSEWDK<br>WVSINPYTIRAKALDEKVSILIEFGFALYHILNQRGGYKSNRKAGSDKE<br>GAVKEGSKVRNIMAKIHARTIGEYFHEIYDNHILQNDTEHDDFDWRI<br>RDKYTHRMFMKEEDALWDAQSFHKELTNDLGEVLKKIIFHQRKM<br>KSQHLJGKCELETDKKRIAKAHLLQFEFRVLYKNINNSISDENGPIKL<br>TEGDRKLFKEIFDKKDYKSWSQLTALINSCTIGCNKNAVNLERGGRK<br>NIEGRTNAALSHKKAFFGEKWYELEDDEKHHVVDVLIHVDKPEIVKNI<br>ALNKWDRTEEQAEYTHIKLTLQRYGGFSEKAHKLLPYLKKGMEES<br>SAIKKAGYSLFEQNPCKMNQMPDQTIKNPVYHIALIELKRVVNGHIR<br>EYGNPDVIRVELARDLKAGYERRQKMTKKMRELEKNDKAYKALQ<br>KEPFNIQYPGYNDIWFNLWEECDKTCPTYTGKTPAEAFNSGEFQIEHIL<br>PFSRLDSYANKTLCEADFNRRKGNRTPWECVAGIMEEDTMLQRIR<br>NLPWNKRKNFTQKEIDEKFLNRQLSDTRYISKEASSYLKHLSCERVE<br>VVKGQTTSLRHLWGLNGVNLKEGPDKNRDRHHRHDAIVAFN<br>RSTLKRLEDENKRGTAEWMDADESGRATNDEIKRRLGGRIDLSEWP<br>TERNDVEYSINNTVSHRVNRKVSALHEEYTGPTDEPAPKNKEMIV<br>LRKSVHQLSKKDLGLRDETIRQIVNDEVQKRMNDGESQANAIASLEA<br>DPPETSPKAKVPPIRVRLMKKDPQIMHYFENKNGEEDRAALYGNH<br>IHAIYETSDKNVKKQIGIVIPMMEAARRVKDGDPIVMKDYRPDIHTL<br>YSLAKNDMIFNIEDEQIYRVQKINSIDGTIMFRQNNVAMKQSDPGVYF<br>KSGRLGASKIKISPIGEIIPAND<br>PCT/US2022/041755<br>MDSVTLGLDIGSNSIGWSLJKEKDNPTIHDIGVYFPEGIDRDTKGAEISK<br>NKTRNARSRMHIQRRSYRKSCLVKISREQGILQEDKELDKLFLKD<br>PYELRAKGIDEKISLFEFGALFHLNQRGGFLSNRKSGKSGEDGVVTKS<br>ASELQSTIKKTGCTLGEYLNKLDSTERRRSYITFRSMYEEFEKLW<br>EKQKEFYPKILNDDLKKVKDETFQRPWRDRTDRCDEPGEKVC<br>PRSDWHARRFRILQDINNLEIYNTDGSDDLSDERRKVLLELLNKKD<br>MTFGALRKKGLEFSQITNLEEGSADKKKAKLKGDEFAAQMRSAKIL<br>GKKGWELNESQRIENDLVDDIEDNELVKILIDKYRFSQTQAEATL<br>DISLPKYSFSKVAIQKLLYMEKGLVIEAIQAVYGKPAITNKGEL<br>MDFLPMPEDLRNPANRGLFEYRKLVAHREYGPKKINIEMAREVK<br>GSKRERDEIHLKQYKNERNEEARKTLIDDFKIPNPSRDDHIKYKLWVE<br>CNKVCPTYTGKSIHQHQLFGPNFEQIEHIPYSRCLDDSYMNKTLCFVD<br>ENKEKGNETPYEYSEKIPKQYEQILQIRITLTPYPKRRRTSQQEVKLDN |
| MG6 エフェクター | 11745 | MG6-5 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

【 0 6 5 7 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 2】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明           | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------|-------|--------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |              |       |    | WO 2023/028348<br>PIERQNDTRYISREVVYKLLKGLVIVKGTGRQVTSERHQWGLNNIL<br>DLAGEGLKNRDDNRHISDAAVTAVIGNEHLRELARTKFRKNNKEFK<br>QPWPDFREELEEKIHINVSYVRQKRGALHEETSYPGTGRKDEKGGQ<br>DIFVYRKKLEDLTISMVNKIVDLVVRDIVKKRLVERGIDPEKDKKIPKE<br>VWNEPLYMIKTTSKDKVQIRKYQIDVNNMIMLKDKKGKPCRAVA<br>PGNNHIEFEYKDKGGKGRGVITMFAVQRSOKRESVVKRDYGV<br>DGKEFVCSLATNEMFINDNVGNTELYRIQKITQSGNNKTHILRPHITYA<br>GKLSDDKPLQKQKSPNTLKGHKVTVDMIGREHMANDE<br>MSNKTILGLDLGVSSIGVAIERNDENGRIVKSGVRVIPSSKSELSYFKD<br>FDKGPASFSEKTERGIRRSYFRKLRRAKLIIEHLKENNMDFPELL<br>GPKYSIDVWREWREKATKEKITLAQLGRVLLHINQKRGYKSNRKAIVD<br>EESDSNWLNAINDNSKLLREKGITVGEYFYQEGKLHERPKVKFALHF<br>RMKVRFNRKDYLDIEJEWKQSEFYFPELTDKESIDHITHIYQRPPL<br>KSAKHLSECRYEKMIHVIARSNPLFQFRVLEKVNLRADAFGNRR<br>ETDEEKLKIEACTSAQSWKLLDKKNLSKSKISILGLGKDYEINLDS<br>IEGSKTLHSIWEVLMKSWGEAGWDIDFWSIQGNDSEKQSYQLWHA<br>LYSIDEQYLRKKLCEGFGFDLTARLNMNIRLESYDYGALSARAIKRIIP<br>ELLKFPKDATKAENAGYKFTDSEKREESRELKDRIEHLKKGALRN<br>PVVEKVLNQLVTLVNAIYAPPELNPDEIRVELARELKSGAKERRAE<br>LGMARAAKDNDRIRELLQTEFGIPYPGRRDILRYRFWEQDMRCVYS<br>GDVPRNKLFGEEYELDHIPRARIENDSNLVLVKSENKDKSDMT<br>AADYMKSGEKAFFEEYLYRVKNLYDKGAKKAGERSGINKGRNF<br>LIMKKEIQQDFIERQLESQYIVKEAVKLLKEVCRDVTTTGTGKITDIL<br>KHQWGANVYFRNIQVPKYRKWGMTEITIVDRKTGEVIERIHWKSRKD<br>IRIHIALDAIIVACTRQSYIQQLNRLNLYENDYSELKSYRKFLPWPSF<br>HNDLSSLESLLVSFRNKRVRATMKNKRIKVGKKKYIVQKTLTPRDA<br>FHLETTYGRRLLVNNYKLYKLNKKSMEALVIDPDLKEKILNRLMEF<br>GNDPQKAFANLKNPFKWKNENLEEVLYDEVFTTRKKLDEKFNPSSE<br>HIDPEVREIVTQRLKEFDNNPKKAFADIEHNKPVWYNKDKQIRIKTVNIR<br>AKASDLVPVTKENGPNKDFVETRNHITHVYQKEDGKYDYKVTSEFW<br>EAFELKKAAMPYIKENDDAKAVLHJLINDMVLVDLNPEDLDQNDPE<br>FNTLSEHLRYVQKLASGDVTFRIHIELELSNKNTEVRVTNAESLYNR<br>VVMYPLDVLGLPK<br>PCT/US2022/041755<br>MDNLILRREKMLVTKIKNTYPOISDDEIKAKKLYKDWGRLSATLLN<br>SSTIAYEDKAFGELVTIISALRHTNKNFMELSSYCSYDFIGKKEFGS<br>ROSSNGKLTYSKVEEYVSPSAKRSIWQTLTILEEKKKMGCEPKRFIE<br>MARSKESKRIDSRLKQLQDLKYKKCREENIDFMPKDEFNALKTQLSS<br>KKEEDLRSKLYLYYTQMGRCMYTGERIELASLYDNLYDIDHIYPRS<br>KTKDDSLNRVLYKKQVNAAKTDIYPLDAAIRTKMHISFWKLLYDKGFI |
| MG7 エフェクター  | 11746 | MG7-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| MG71 エフェクター | 11747 | MG71エフェクター   | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

【 0 6 5 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 3】

| カテゴリー        | 配列番号  | 説明             | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|-------|----------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |       |                |       |    | DERKYERLTRSTQLRDEELAGHSRQLVETROSTKAVAAILKTAYQNSE<br>VVVVKAGNYSDFRQFQFVKKRDVNDLHIAKDAYLNVVGNVYHVKF<br>TANPLNFTTKNQDNRYSLSKPEIFYKFSIKRDGEIAWLGGEDGTMAIV<br>ARTMHKNILFTRQPLEGKGLPKNPLKAKSGQLPLKAGLSVEKYG<br>GYDSLTTAYFALVKSEKQGSVQLSIEGIPLYYAKQGEKAVQDYLTEV<br>VQLCKPEIKPKIKYSLFKINGFPMHISGRIGKQLVYFYGAGQLCIADD<br>VADYLKALKHETDIAEKEKTLADQNADDIQOKAKQKGLDFVEQKW<br>GISGAVNVQLYDMFIASANNLYKNRPASQTTTLKEKREHFVKLTLSK<br>QHIIKEILNLFKASASADFKLIDKGTSCGTLKISNNITKLKECILNQSP<br>TGYFEQEVDLMKL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| MG99 エフェクター  | 11748 | MG99-1 エフェクター  | タンパク質 | 未知 | 上記配列番号 1 1 7 1 6 と同じ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| MG112 エフェクター | 11749 | MG112-3 エフェクター | タンパク質 | 未知 | MGYNKVVGLDYGVSIGWGLVQLDEEYADEKQDQGTVEEYKVTID<br>GKIIAAGVRRFQLPQDRQKKSALIRGTARRSRRTIKRARRLRKRIEL<br>GKEFNLLGNDFDRDKFLPKKGGDKKWDWTWFRKEALERKLTDEEF<br>FRVLYHIAKHGAYFTQRAERLELEKDSKAKDQGEKGEKQDNEKK<br>KEREKMKGLKRIQELLKRSQYKTVGAMFYEMFKNGRKNRNPDKYS<br>NSIRRELLHDEINEFKAQRALGNEKADPDLKQYLRAVLMQEKGGPDD<br>EKMOMIGRCEIKELCSQAGKECTADCPDLNRCRCAPKESYTAERPV<br>LFRNLNLSKJUGGQADLAKHRDNEKLAETHDKIDFSQIRKELCLTDKP<br>HLRNLCSYSEKNPEYEKTLKYEVSNQQLQFGPEHRYQMDNFDGET<br>KVFDKEIRAFQKRLATTNPKKNVRYSDIRKELQGPQVDLAGFKFTA<br>LKKEYTKSSAQLESEFTKPKNGKNFNGDAAYIKQFEDDAIFVELKG<br>YHKIRKVLNDRDGTWEKLSDGTTRIDTIAEALTYCKKDETRTAYLKER<br>GTTDESVIDAALTLMKEIATYSKEAMVKLLEHMEKGLLVNDKARC<br>GYDKFEHKKQAYLAPYSGFENNPPVARVIAQTRKVYVNAIVRKYGEQ<br>YPIDQIHIEVATELANSEKTRKRIKDAQDNKDEKRSARSICEEFGNSD<br>MSRNFNDGNMNNKILCCAKANQDKNRIPFEWFEETHGPSNQWFEFT<br>RRVEKMYDVPYSKKNLLRKSMTDEEMKKFMDRNLNDTRYATRHIA<br>DYLRYDFNSRRDDIKDYSRIKLSGGVTAFRLYLCGLNKNRDNEL<br>HHATDALITACATDGHVFLVSNLSKQIEEKGKNWYKHFGEKMEKPLR<br>PWETVREDILEATQKIFYSRMPRIKVTSAAHDEDEVWSFDEKKRTKA<br>QKKKKSSIPKDTARVMKINNGYAKIGEIVRADVFEDGKHKHNVVPIYA<br>VDIFSCKPLPKYLKKNNTPYDEWPSAAADNLTTFKSLFKDDLITNGT<br>PYVYDFVEGTQANUKVRNINGSKFESTNEKTRKFGYRNIELKKFSYDM<br>LGNYKEVEKEKRLGNEGKWTKKRPPK* |
| MG123 エフェクター | 11750 | MG123-1 エフェクター | タンパク質 | 未知 | MRIUGLDLGIASCGWALDQAKDGEGRILALGVRCFDAPEDSKDRTP<br>NNQARRQHGRRLRVRRRRQRMQELRHLFLAHLGLASAGPDALALP<br>GIDPWAMIRAEALDRALAPCELAVALGHIAHRIHGRFSNRNQRSNEAED                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

【 0 6 5 9 】

【表 3 1 - 2 4】

| カテゴリー        | 配列番号 | 説明             | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|------|----------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |      |                |       |    | WO 2023/028348                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|              |      |                |       |    | RTMLAALAAARQERTGHYRTIGEAFARDFEFARRKRNKRDGDYGRSILRE<br>EHREVRLLJFARQALCSQCATEALEAQFDIAFFQRPPLAAEDRVGPGC<br>PEPGERRSARFAPSFELFRFLARLLTLRIGTRREERALTAEIARAEEQG<br>FGTQGGNTFKRLRLNLAAEAGFISPEDEGRDVRNVRSPNGGCMR<br>CSAALRQAIGEGAWLRLSTPERLDAIAFVLSFAAKEPERLAALGIE<br>EDVIAAVLAGVEQGMDFHAGAGHISAKACRKIPGLRRGLVYSEACQ<br>EAGYDHARRPETSLSDVANPVARKAIGETLKQVRAIVAEGYGLPERHIE<br>LARDVGKSAEERAELAREKRNRRRLRIFVETVGREPAGSEDML<br>RFELWLEQAGRCLYTDICPPDAIVAADNRVQVDHILPWSRFGGDSFA<br>NKLTCFATANQEKGRTPFELGADQERWNRVAVVEGCKGMKGR<br>KKRIYLLKDAVSSEKFRTRNLNDRYAARIVLEHLAHFVPEDGSRVFE<br>ARPGALTDRLRRGWGLQDLKKLEPDGCKRIEDDRHHALDALIVAA<br>TSALQRLTRAFQEAETRGSHRDESALTSPWPGFVDQAQEAFTILVS<br>RAERGRARGEAEATIRQVRKDEGPPVYERKSVEALTEKDLARVKD<br>PERNAALJESLRAWIAAGPKASPPLSPKGDPIAKVRLRTDKKPAIEVR<br>GGVAERGEMVRVDVFRARNRHGRWEFYLVPYPIHQVADKVRWPTPP<br>DRAVQGNTPPEEQWPMIDAGYEFLLSHQRSFIEVEKRDRTVITGVFM<br>GLDRHIGSIASTPHSTKALARGIGARTLMRFEKFRVDRLGRTEAVRQ<br>ETRWHGVPCT*                                                                                           |
| MG124 エプエクター | U751 | MG124-1 エプエクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|              |      |                |       |    | MTLTLGLDIGTNSIGHALVETDEQGNVISLKHGICVRIFSRSRTDKEKKP<br>LNEARRTARQRQRERKKSRMKAVLRLREHGLDPQDSLESFYAA<br>RAAALTGPLSRSQVGRAIWHIAKHGPRPLVRKDDKEQGVKEGIRSLR<br>TEMLAQKARTYGELLERIRLNGSVRLRANSEGSYNRYPSRQVMEAEF<br>NHLWESQVPHHPEVMTALRERLITAFYQRLPKPVYPGRCTLEPDEY<br>RMPKAMPMAHEFRIRSEVANLTKQGDVRLTANERQIVVDGLNS<br>EKLTTALAKLLGFRAGVKFNLEGGDGGCKARNYLIGDLTSSKRSV<br>WPNFSKMPENMRLSLJLALLDIDDELELKCKLRSDFGISPEVVDQLSSL<br>MLPAGVINLSQKAVRAVLVYLOQGMGYAQACAAAGYHHSDDRPEEL<br>TPILPYNELPGMKRYLGQEQKQKPGRISNPTVHVVALNQVRKYVNTLV<br>EVFGVPCVNEVTRCLKQTAQOKIAANKQNAANKKVRDAFKEKFPPE<br>RANSDDLVWRWLWNLPEERKVCVYSGKEITLNDLSPRVEIDHPIPH<br>SISFDNPSNLVLCQAQGANRLKTNKTPHEAFAPGLHKEFNWSAIEQVRVF<br>ELADKCGTWAKKKLRFKPDYLDVGGDFATRLQNDTAYLSKVVRYL<br>GHSCPKVAVRGAVTAICRKEWGLDRLLRDLTVSDHADLFCLSYKSTG<br>VEMAPHHVTGGSHDIREDCSVNKLKFGAEVVRVDPGRFQTPGEIRRI<br>EPRGPKVNFQNLRTTTRKPLTSLTANSISQIKDDGLRTKITAHKEVNP<br>KLLTDTLNRKAEKVELSRLLEGFGQKHSGRVRIVANKSGVIVRHGAAN<br>QHTKVLADTNHHGDDVVRDQGVKMLLTTYAELNHPPEVEAGWTLK<br>MRLHKGDMIRVPGYVYVNYKPKPNYKGRSDRHHIAVDAFVIACITP |

【 0 6 6 0 】

【表 3 1 - 2 5】

| カテゴリ        | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------------|-------|---------------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG125 エクスター | 11752 | MG125-1 エクスター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>SLLRKISRSIALSKYNQLHFFPEPYERFKQELKTHLRKLVVSNKLDHISIS<br>APIFTETNYGFTA*<br>MRPYGIGLDIGISSVGVAAIALDHQDSPCGILDMGARIFDAAENPKDGA<br>SLAAPRRKRQRHRRHRRNRMRMLKEGLSEALTLGLFDGA<br>LEDIYALRTRALDEALTKEQFARVLLHLSSRRGFRSNRRATAAQEDGK<br>LLDAVSENAKRMADCGYRTVGEMLYDVAFAKHKRNKGGEYLTIVS<br>RAMIEDEVKLVFASQRRRLGSFASEALEQGVLDILLSQRSFDEGPGGNS<br>PYGGAQIERMIGKCTFYPEEPRAACYSFEYSLLLQKVNHIRLQKDG<br>ESTPLTSEQRQLQELAHKTENLDYARIRRALQIPDAYRENTVSYRIESD<br>PAAAEKKEKQYLRAHYHTMRKAIDGASKGRFALLSQEQRDDQIGTVLT<br>LYKSORISEKLEAGIEPCDIAALESVSGFSKTHISLRACKELIPYLEQ<br>GMNYNEACAAAGIEFHGHSCTERTVVLHPTPDDLADITSPVVRRAVAQ<br>TVKVNAYIRRYGSPVFNIELARELAKDFTERRKKLEKDNKTNRAENE<br>RLMRRIREYGKMNPTGLDLVRLLYEEQAGVCPYSQKQMSLQRLFE<br>PNYAEVDHIIPIYSISFDDSRNKNVLAENRNKGNRLPLQYLTGERRD<br>NFIVWVNSSVRDYRKKQKLLKPTVTDEDKQQFKERNLQDTKTMISRL<br>MNYINDHLQFGVSAKERKKRVAVNGIVTSYLRKRWGTIKIRGDDGL<br>HHAYDALVIACATDGMIRQITRYAQYRECRYMQTDTCSAIDEATGEV<br>LRIEYPWEHFRKELEARLSSDPARAVNALRPLFYLDGSEPLPKPLFVS<br>RMPRRKVSAAHKDITVKSFKAMAFGKVIVRRALTDLKLNGEJENYF<br>DPGSDRLLYDALKARLAAGGDKAKAFREPFYKPRHDGTPGPLVKKV<br>KLCEPTTLNVAVHGGKGVADNDSMVRIIDYFVEGDDGYFVPIYADTL<br>KPVLPNKACVAFKPYSEWKTMDDRDFISLYPNDLIRVTHKSALKLSR<br>VSKETLPESIESKTALLYVSAGISGAASCRNIHDSNYSYEIKSMGKITLE<br>KLEKYTVDVLYGEYHKVEKERMPETGKRS* |
| MG125 エクスター | 11753 | MG125-2 エクスター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MLSVAIGLDIGISSVGVATVADGEDRPSGJIGMGSRIFFDAEQPKTGD<br>SLAAPREARSARRRLRRRRHRKERIRALIREGLNETQLAALFDGQ<br>LEDIYALRVRLDEAITAEALARIMLHLSQRRGFSLNRKTAASKEDGEL<br>LAAVANSRARMQAHGYHTVGEMLLKDESIREHRRNKGKAYISTVGR<br>DMIVEEVRIQIFAAQRITFGNVAASEALEANYLEILLSQRSFDAGPGEPS<br>YAGSJENMVGKCTLEPDESRAARATYSEYFALLEAVNHIRLTGAGV<br>SAPLTAEQERLIALAHKTADLSYAKIRKELNIPAEQRENAVSYGKSDS<br>PDEAEKTKLKQKAYHQMRGAFAEKASKGSFVLLTKEQRNAIGQTLIS<br>IYKTGDNIRRSRLDAGLSEEQIAIVEGLSFGFGLSVKACDKLIPCLEQ<br>GMNYNDACAAAGYAFRAHEGQEKLLPLNAEAKDITSPVVRRAV<br>SQTIKVVAHIRERGGSPTFINIELAREMAKDFERTQIKIHIDENRKQN<br>ERLMEIKNEYGKSAPTGLDLVYKLYEEQAGVCAYSLRQMSLEHLF<br>DPNYAEIDHIIPIYSISFDDGYKNKVLAKENRDKGNRLPLEYLNKRRR<br>EDFIVWVNSAVRDWKKKQRLLEKHITQEDAEKFKERNLQDTKTASRF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

【 0 6 6 1 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 6】

| カテゴリー | 配列番号  | 説明             | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------|-------|----------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       |       |                |       |    | WO 2023/028348<br>LLNYADNLAFAPFQTERKKHVTAVNGSVTAVLRKRWGITKTRANGD<br>LHHAVDALVIACTDGLIQKVSRYAQYQENRYSADGGLVBLITGEV<br>VAQFPWPWAFHQELDRLSDDDPARAVRGLGLAHYATGPRPLPFVS<br>RMPRKITGAHKEIKSPRALDEGLITKTPLDALKLDKDSIAGYK<br>PESDRLLYEALKEKRLRQFGGKKAFAEPRKPKHDGTGPGPLVTKV<br>LCEPTTSLVAVHGGGLGAANNDSMVRDVFHVEGDGYVFPYIADTLK<br>PELPNKACVAGKKPSEKWRNPNDFVSLFPNDLIYVSHRKGICLSLV<br>NKESTLPASREEKCTFLYLVKGSSTASLECRNHDNTYHKSIGIKTLE<br>KIKYTVDLGEVHKIEKEPRMPFTNME*<br>MYPYAGFDIGITSVGWAVVAVALDGEDKPFGHNNMGSRIEDAAEQSKTGA<br>SLAAPRRREARSMRRRLRRHRIHRHLLVAENVTISQAELDALFEGK<br>LEDIYTLRVKALDITAVSHADFARILLHIAORRGFSNRKSKSTSKEDGEL<br>LAASANRALMAEKGYRTVGEMLLKDPQYSGSKRNKGKYLATVGR<br>DMVEEVRAIFKAQREQQAFAATELEFYLEILLQSRSFDEGPEGGS<br>PYRGSQIEKMIGKCTILEAGEPRAAKASYSFEYFTLLQNIHLRLICGGE<br>SRPLSDAQREFLIAHKTDLNFSRIKELDIPADTTNNAVYSKADGY<br>EDAEKKAKFCYLKAYHQMKAAFNKLSKGHFDLSARQKNELGRVLS<br>TYKTSANIRPRLAAAGLSEMEDIAETMSFSKFGHISVKA CDKLIPLEK<br>GLKYNDACAAAGYDFKGYDSETRLLHPTEDDFADVTPVVRRAISQ<br>TAKVLAHIRERGNSPTINIELAREMARDFTERSKMKKMDMDENHARN<br>ERIMERIRTEYGKEHPTGQDLVKFKLWEEQHGECAYSQKHLKHLF<br>DPDYAEVDHHPYSISFDDGYKNKVLVLAENRNKGNRLPLLQLQGERR<br>ADFVWVENSIDYRKKQRLKETITAEDEKGEKERNLQDTKTMRSFL<br>LNYSDHLEFSDSTGRKKHVTAVNGAITSYLRKRWGIAKIRENGDLH<br>HAVDALVVCTTDGMIQQLSKYSTLRCEYVQTEAGSIASVSMHTGEVL<br>KRFPYPWPEFRRELEARLGDDPRRAVISQRPYANGDIPVRKLFVSR<br>MPRKVTGAHKEIKSPKALNDGIVVKKRALTDLKLDPKTGEISNY<br>MPQSDRLLYEALKEALKKHGDDAAKAFAPFKPKSDGTPGPVNVK<br>KLCEPTTLNVAVLNGAGVADNDSMVRDVFVRVENDGYVFPYIADTL<br>KALPNKACTRGKPYAEWREMDAEDFLSLYPNDLIRVTSQKGLTSLK<br>AQKESTLPDYETKQEMLYTTSASINTAAVACRTHDINSYEIKSMGKITL<br>EKLEKFTVDVLGEYHKVEKEPRMAFCRK*<br>PCT/US2022/041755<br>MRSYAGLDIGITSVGWATLALDGNENPCGHGCMGARIFDAAEQPKTGE<br>SLAAPRRRAARSSRRRLRRHRIHRNERNKLMVSKGVLSSELETLFDGR<br>LEDIYALRVKALDGKYSRSEFARILLHLSSRRGFRSNRKNPSSKEDGAL<br>LKAVSENAERMEKHGYRTVGEMLLCDEAFKQHKRNKGNYLTTVTR<br>DMVADEARAIFAAQRSGSEYASEEFENEYLEILLQSRSFDEGPGGNSP<br>YGGSQIERMIGRCTFFPEERRAARATYSFEYSLIQKVNHIRVINGAA<br>ERLTAEQRNTVIELAHTTKDLSYAKIRKALKLSDGQLENIRYSDKASAE |
| MG125 | 11754 | MG125-3 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MG125 | 11755 | MG125-4 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

【 0 6 6 2 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 7】

| カテゴリー        | 配列番号  | 説明             | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|-------|----------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |       |                |       |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| MG125 エフェクター | 11756 | MG125-5 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>DTEKKEKLGVMKAYHQMRSAFEKQSKGRDFVTTPQRNDIGTALSLY<br>KTSDKIREYKDGDEIDMDAYESIGSFSGFHSVKACDMLPFLERG<br>MNYNEACAAAGLNFKAHDTGEKTRFLHPTEDDYEDITSPPVRRASQT<br>VKVINAIIRKEGSPFTINIELAREMAKDFTERNKLEKKENDENRAKNEK<br>LLERIRTEYGKSDPSGLDLVKRLRYEEQGVCMYSLRQMSLEKLFSPN<br>YAEVDHVPYSKSDSDSRKNKVLVLTENRNKGNRLPLQVLTGQRDD<br>FIVWNNVRDYRKRRLLKLTLDDELGFKERNLQDTKTRSLFL<br>NYISNLEFAESTCGRRKKVTAVNGAVTAYMRKRWGITKIREDCDGLH<br>HADVAVVIACITDGMIOQVSKYARLRECRYMPTTEGSLVIDDCTGEVL<br>HQFPYWRDFRKELEARIGTDPARTINDRLFPYMSSGMPPLPEFVSR<br>MPKRYTGAAGHDTVSPKELDKGVVVKRPLTDLKLDKGKJENYV<br>NPQSDRLLYDALKKALJEHGGDANKAFAGEFHKPKSDGTPGPVSKVK<br>LLEPTTLNVPHGGAGVADNDSMVVDVLTGKYNLYPIYVADTLK<br>PELPNKAIAAHKPYSEWPEMSDDDFSLYPNDLYCVTHKKGKGLTVTN<br>KNSLTPPTVEGKSMLYISTNISGSIKGIITHDNTYEIGGLGAKTLEKL<br>EKYTVVYLGEYHKVQKEVRQPFNKR*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| MG125 エフェクター | 11756 | MG125-5 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MRPYAIGLDIGITSVGWAALALDADENPCGHIDLGSRIFYAAEHPTQGE<br>SLAAPRREARCSRRRLRHRHNRNERSLMLERLISQDELETLFDGRL<br>EDIYALRVKALDEIVSRITDFARILLHISQRRGFKSNRKNPTTKEDGILLA<br>AVNENKORMSEHGRTV'GEMFLLDFTKDHKNKGGNYITTVARDM<br>VADEVRAISQAQRELGSFASFEFEERYLEILLQSRSFDEGPGGNSPYGG<br>SQIERMVGRCFTFPDEPRAAKATYSFEYFTLLQKVNHIRIVENGVSXKL<br>TDEQRRHIELAHITTKDVS'YTKIRKALKLSDKQLFNIRYTDNLPAEDSEK<br>KEKGLMKAYHQMRSAIDRISKGRFAMMPRAQRNAGTALSLYKTSID<br>KIRKYLTDAGLDEIDINSADSGSFRFGHSVKACDMLPFLPEQGMNYN<br>EACAAAGLNFKGHDAGEKSLHHPKEEDYEDITSPPVRRALIAQTIKVIN<br>AIIRKEGSPFTINIELAREMAKDFERNRIKKENDDNRAKNERLERIR<br>TEYGNNTPTGLDLVKRLRYEEQGVCMYSLKQMSLEKLFEPNYAEVD<br>HIVPYSISFDDSRKNKVLVLTENRNKGNRLPLQVLTGRRRDEFVWV<br>NNVYKDYRKRRLLKEELTAEDESQFKERNLQDTKTRSLFLNYIADN<br>LEFAESTRGRKKKVTAVNGAVTAYMRKRWGITKIREDCDGHIAVDA<br>VVIACITTDAMIRQVSRVARECEYMQTESGSVAVDTGTGEVLRITFPY<br>PWDFRKELEARLANDPAKVINDLHLFPYMSAGRPLPEPVFSRMPRR<br>KVTGAAHKDTIKSARELDNGYLIVKRPLTNLKNGEIENYNNPQSDK<br>CLYDALKNALJEHGGDAKKAFADEFKPKSDGTPGPVSKVKKLESAT<br>MCVPVHGGKGAAYNDSMVVDVFLSGGKYVLYPIYVADTLKPELPNK<br>AVTRGKKYSEWLEMADEFISL'YPNDLICATSKNGITLVCRRKDSITLP<br>PIVENKSMLYYRGTDISTGSISCIITHDNYKRLGLGVKTLEKLEKYTV<br>DVLGEYHKVQKEVRQPFNKRKACPSEML* |

【 0 6 6 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 8】

| カテゴリー      | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------|-------|---------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG3 エフェクター | 11757 | MG3-18 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>MSTDMKNRYGVVDGDRSVGLAAIEFDDGGLPIQKALAVTRHDDGGLD<br>PTKNKTPTMSRKETRGARRTVMNRKRRLNLDNVLENLGYVPE<br>GPEPETYEAWTSRALLASIKLASADELNEHLVRAVRHMAHRGWANP<br>WWSLDQLEKASEPSETEJILARARELGEKVPANPTLGMALAAAN<br>NEVLLRPRDEKKRKTGYVVRGTPLMFAQVRQDQLAELRRICEVQGIE<br>DQYEAIRLGVFDHHPYVPKERYGKDPINPSTNTRIRASLEFQEFRLD<br>SVANLRVIGSRKRELTEAEYDAAVEFLMDYADKEQPSWADVAEKIG<br>VPGNRLVAPVLEDVQKTAQPYDRSSAAFEKAMGKKTEARQWWESTD<br>DDQLRSLLIAFLVDATNDTEAAAEAGLSELYKSWPAEREALSNIDE<br>KGRVAYSQETLSKLSYMIHEYRVGLHEARKAVFGVDDIWRPPLDKLE<br>EPTGQFVDRVLTILRRFVLDCEQWGRPRATVEHTRIGLNGPTQR<br>QKILNEQKNRADNERIDELRESGVNDPSRAEVRRHILVQEQCCL<br>YCGTMITTTSELDHIVPRAGGSSRRENLAACVACRACNAKKKRELFYA<br>WAGPVKSQETIERYQLKAFKSKKAKMFKNQIRRLNQTEADEPIDER<br>SLASTSYAAVAVRERLEQHFNEGLALDDKSRVLDVYAGAVTRESRA<br>GGIDERILLRGERDKNRFVRRHHAVDAAVMTLLNRSVALTLEQRSOLR<br>RTFYEQGLDKLRDQLHPGEDWRNFTGLYPASQKKFLWKDAATAL<br>GNVLAEAIEDDSIAVVSPLRLRPQNGSVHDETIDPVKKQTLGSDWPADA<br>VKRIVDPEIYLAMKDALGKELPEDSARSELDPGRFVEADDEVLFPP<br>ENAASILTPRGVAEIGGSHHARLYGWLTKKGELKVGMRLRVYGAEFP<br>WLMRESGSRNVLSMPIHRSQSFRDMQDTRKAVESGEAEFAWTQ<br>NDELEFDPDYIAHGGKDELQFLGFEMPECRWRVVDGFKKNYQIRIPA<br>MLSREQLPSDIQRRLESKTLTKNESLLKALDITGLVVAIGGLLPLETLK<br>VIRRNNGFPWRGNGNLPTSFSSSALRALGVEG<br>MSAPLNVRLGFDVGERSVGFAAVEYDDQGYPLKFLAIGSYLHDDGMD<br>PTTNKNPKSRKETRGVARRTMRRQKIKRLKTKTDKVLRELGYQVS<br>HYTDEPQTYEAWYSRRLATQKLSSEELNDHMVRAVRHMAHRGWR<br>NPWWSLTQLESASAEPSFTFVQMFKAQERWADDELILPIETTLGMLG<br>ALSDDNKVLLRPRTYDSKKEHKEKLVNKGEEPVFAKVRQEDILREL<br>RIICVRQGVESQYELRKALFDQIRPIVPOENVGRDPLDPSQYRALRAS<br>LEFQRYRLDALANLGVREGRGKPRSLTGEERTQAWKFLSTYVRDQKN<br>APTWGDVAAEAMGVEPALLYAPVIDEVRNKAPYFSSSLVAVEKKLKKK<br>HQYKWWVEASVESRGLIRVADATNATLDEASEAGLLEIEGLPEE<br>EREVLDGLSFETGRAAYSADTLTKLADYMEEHLAEGIGVHEARKAVF<br>GVDSSWQPPKATLEATGQPTVDRVLTIVRRVLSAQRWGDPAEIM<br>VEYARTGLMGPAQLAEVKREIAKNRKRDRIRQDLKDGCVSEPKKRH<br>IMAHRIVDQNCQCMYCGAMITAAASCELDHIVPRAAGGSSRRENLAG<br>VCRDCNASKGGRMEADWAAADNPRGVSLKDTLGRLSWEPEPKADKK<br>RLLKLIERRLKQSVMSPEQIDERSLAPTAYATAIRERLRRHFEDDAKP<br>PCT/US2022/041755 |
| MG3 エフェクター | 11758 | MG3-89 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

【 0 6 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 2 9】

| カテゴリー      | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------------|-------|---------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG3 エフェクター | 11759 | MG3-90 エフェクター | タンパク質 | 未知 | IPRKDVVKAAGGLTRESRRAGLIDEKLLRGRSDKSRLLDVRHHAIDA<br>AVLTMLNVPVARTLEERRLMKRERDLSARDNDWRDYTGTAEDKPKF<br>VQWKAAAGEMADLIDAVDQDSIAVINPLRLPQNGAVHDDTIRPLEE<br>RALGAEWDPATIKRVVDPISYIALDALGKSLPADSQDLVLDGDT<br>LMSADDSIALFSTNAASILTTPRGAEEIGSVHIVRLYAWDRDKGEIEVG<br>MQRVFGAEFPWLMRESGVKDVFKVPHRGSQSYRDLQDGVKRGESG<br>AAVEIGWITQGDIEQLNLDEVDRDSMRSKELLTFLEIPETRWVVDGLPD<br>NRRLMRPVLLASEGIEELKNAPEIDQITVNVFNFGALLSVSKYLAL<br>TETKIRYNHILGFPRWVGVRPVSLDIQRAAREALEGKK<br>MSQATKYRIGIDVGDYSVGLAAFEFDDAGFLPKKLAMVYTRHDGGL<br>DPTQNSPKSRKKTAGVARRVRRKRRKRLKLDLKLLELGYLP<br>EGEEAQTYQAWKSRAALLTSQIEDKAEQAEHLVRAIRHMARHGRWR<br>NPWWQFGQLDSAPVPSPTMVENLHARLLWPGYTTDQTTVVGELGALA<br>ASPDILLRPRTRDIKKKPNGLHHQEGVRAVLGSKYRQEDLLAEVKIIV<br>QVQELPVSHYEELARALFEQVPYVPAQNVGRDPLPGRHILPRAPRAS<br>LEFTERIRQAVANLVRREGREKVPLTSGQHIAAVNYLMNYADKQPTT<br>WGDVAEQIGVEPTRLVAPVDDVRLNKAPYNHSTSVFTRALPKKSEAM<br>QWNSADVSLRSLHJELSDPTEATAAADESGLSAIFESWPEKEREKL<br>EGLDFESGRAAYSISLIDLNQYMEEHQSDLHTARKEYVGVDDSWQPP<br>RENLHEPTGQAVDRVLTIVRRFVMACERKWGKPDRIVIEHARTALM<br>GPTQRHEVLRERQNRDANERIREELRADGLTSPTRADVRRHRVVQNQ<br>DKCLYCGTMITTATAELDHIVPRAGGSSKIDNLVAVRCGNADKGR<br>IPFAVWAEQTSREGVSLDDALNRLWSFDKVVYKGVAGRKLKAQIARR<br>LRQAEDEPIDERSLESTAYSAAIRHIRETYENTSRGLNRGDDGTFID<br>VYAGALTREARRAGGIDEQILLRGQRDKNRDVRHHAVDAAVMTVLD<br>HSVARTLAQRNLIVREDRLKRRENQDDTRWREFTGLGGEAQEKFLVW<br>KQKSYVLADLLAEALAEADSIPVNLRLTPRNGSVHKTLSLDDKMYLG<br>GSWSSKDIARVVDPDIYALAMELLGRATTLDEDPQRSITVYKGVQLAD<br>QEIKLFPESAASHLAGTGAVKIGDSLHARLYAWPTKKHGEIGMLRVF<br>GAEPWLFKTYGTKNALTVPHPGSQSYRDMKDTLRKKIESGEAREIG<br>WITQGEDEIKIESYLVQENDELGRFINLIPENRWKIDGFDNDNGRLRLPI<br>LLSYEIEPESYGEDVYLGAKNHQIRKVLERGAIITAGKILGAEGTKVLR<br>RNHILGAPVWQGGQEARSLDISRAITELEG<br>MSMISTNDDDRVEGHHMARYGERKYRVGIDVGDYSVGLAFIEFDEQDM<br>PSLELRMFTYRHDGIDPTNTKTPSRKKTAGVARRVRRKRRKRRTRK<br>LQELDALLMASGFPVIVSVGETYECWQARAAAVEGFTIDEQTRLET<br>SRAIRHMARHGRWRNPWLTVQGFRELEVPTANHRKNIESANSKLHLD<br>LEDSTLGGIAASASASNNWMLRPRNGQKRKEASNPVLVAQVQQADQL<br>AELYKILEYQRIDTITEKIARA VEDQVRPYVPGKNGIGLDELPGMGAYY |
| MG3 エフェクター | 11760 | MG3-91 エフェクター | タンパク質 | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

【 0 6 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 3 0】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明             | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------|-------|----------------|-------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|             |       |                |       |    | WO 2023/028348<br>RASKASLAFQEFVRRAAVANLRVKNSPRGQERLERLDPQDAQVAEYL<br>LTWREDQPPQWGDVANALESIDENLLVPIVFEDAFKLAPYDRITSSDL<br>QRLSSANKKKLAGVREWWDSADTQMRELFTEFTSPNESVYEEADES<br>GESDVFNQWDEAKEVLLGMQESRSAYSESLRRLNLRRTGEVDL<br>HEARLEFGVDDTWKPSLPSIDERTGQAVDRVLTIVRRAIMGAVDKW<br>GVPEAVVVEHARSFGMGASARNLYLNEVSRRTATRAKLEIVKQQGV<br>ERPSDGDIHKWECINRQCTCAYCGNETFTAEIMHIVPRAGGGSNV<br>RENVAVCRRCNSEKRNIPFAIFAESDAHPYTSINETLTRVNRWDWSR<br>DRSEQRLKNRMILQRLKRRESPEIDERSLASTAYAAVEVRQRIAEVILG<br>RITGEDELNRVQVYTGGAATREARRACKIDARIRGCKDEKDFDVRIH<br>AIDAAVMTLNHSVAFTLRERAEKRSATMNRVLPNEEWKDYSGRT<br>SSAQKRTVWRQQAHLADLIVDAVEADSVPAQQLRLSASRGSVHK<br>DTVSALYRKQLGAPWTAQEILQIVDPEIYVHLRDLAAQNKGVLELDFS<br>RRIQLSGVWISGSELVEFPKAAASKYSSGSVEIGEIQIHHARVYAW<br>RGTKGFEQYGLIRVFTAEPLWLQQAQSKDLFTMINIDDRSMYSKDLL<br>QTVRKKEIODEARCIGWLTQNDLNLNVEVLROGSDKIAHFLSTVPESR<br>WKLDPENRRFRIRPLYLSRSGDHLDPICAEILEKGAIVGTSNLLSNV<br>HQHRRDSLGEFRWRSQGLPASWSVPDSTADIVETGLK<br>MAQRRYRVGIDVGRSVGAALVAFDDDGIPERVLIHAYSYRHGGIDPT<br>TNKTPQSRKHTAGVARRVRRMIRARITKRLAALDRALJELGLPVRDVS<br>DGETYEPWRMRARCVETGEDDAERRDAVSRALRHARHGRWPNPW<br>HSVRRERLESVPTATHQKNVAAAQAVFPGEIADATVQOLGGEVASRFN<br>HMIHPRTGKKNPQKTAVLNERVMQADQMAEVVAIWTTIQRMPEAEL<br>NAVLELVFGQRPVVKAENIGRDELPGMCHLPRAPKASFEFQEFIRRA<br>TAAITGVRAQSGSKAERLDADAVDAVSHWLEWDADDDPTWADV<br>VEALNDPRETKAPVFDVRRMTAPVNRRTARILRKALKKRHNAPVRT<br>WWESASAESRAALVAFVLDPTDENEDLLDRTGLSDVAAWPEEVLLDD<br>LTNLNVEYGRAAYSRESLSKNTIMAEQVRVGLJHDARKIAGVDDTW<br>PALPOLSEPTGQPTVDRVLPVIRRVMAAERYGVPEAVYIEHARSALL<br>GPAARAEHQREYNANRREREKNRQILEQGIDDPNRSIRRWIQQVQLQ<br>NCLCLYCGQTHSAAAGGAELDHVVPAGGGSNNRENLAVCRCQNSE<br>KGKLPFAVFAARTQREGVSYEAALERVRFGEQWRPADRAVKRGLVHR<br>LKQTAADDPIDERSLESTAYSAREVRRRLERFYSIHASPEAPRPEIFVG<br>GSITSEARKAGGIDAIURLGKDVKDRFDARHHAVDAAVMTLVDRSVA<br>RTLQQRSDMRVAHRLTGSEPAWREHAGDSAAAQSRFAEWKKSSTRL<br>AELIREAISADAIPVIFPLRLGVNRGSVHKDTVRAAVPKRLGDAWSAAE<br>LDAVVSAPAAHMAISSVFDGAAELPHDDGRMLTVRKRRLHADDTISLLP<br>GHAAAEVNGGVVEIGESIHHARLVAWDRKGVQFGMVVFTAEIPF<br>MORLAGKKDVFSTPHTSTLSYRGVQLRVRKALDAGIAVELGWITQGD |
| MG3 (エフェクター | 11761 | MG3-92 (エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

【 0 6 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 3 1】

| カテゴリー      | 配列番号  | 説明            | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------|-------|---------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG3 エフェクター | 11762 | MG3-93 エフェクター | タンパク質 | 未知 | EIEIGLDDVASMTPEFRQFIAEIQEQRVVRVDFGFKDGGRLRVRPALLSAE<br>GDAAYSDLYSKTLDKGSFVNAAGFAGFATSSVYIRRSALGVPWRWSAQG<br>IILPVSESPYQRAENL*<br>MNEGVIQYRIGIDVYGQNGVGLAAIAFAEAGNPSEVLAMVTHRHDAAGLDLP<br>AAAKQCYSRKTKTSVARRTRRLRRNRRARLKLDEILTSLEGLPAH<br>EYPQTWEAWEARAELOEFPIDNEQELHEKLVLAVRHIMARIHGWKNP<br>WWSWNTLWEAPTPTSNMNEIRDNAKVFADLPPTATIGQIGFVAAAT<br>NRLLRPRKDTTKAKTRPTPVNLAKVMQEDQLAEKLSYWDKQNLDP<br>EWLEKIAKAVFYQTRPKVPELVGHDDLPGMTIKLPRASRSLEQFEFR<br>IRAAIANLKVKVPGRQENFSLVGDKNRIVDLLMGWDDDEAPTWADV<br>AEELNSVRDLKRPEDDPLRVAPYDRSSNAIRNKLVLRLKDKGEALE<br>WWDTADRDQRSLEFATWLGDSQSHDDAFLETSGLSDIASWSEGVMEK<br>IDSLEPGRAAYSIESLKLNRHLAEAGDNLJEARKHGFNVDDSWTPSL<br>PRFEDRTGQPVVDRVIRVIRFINGCVYKWGVPEISIVIEHVRSGLLGPE<br>ALLDYKRETTIRHNEREQIARDLKDQGISERPSGSDITRMRIVQEQQG<br>VCLYCGTAINIHCELDHIHPRAGGSGNFRENAAVCRECNRLKGGKTPF<br>ARWARETSQEGVSEGLADRVKNFVNGSTADLNLKRRVSQRLRQT<br>DEDQPIDERSMASTAYAALEVDRVREFTSRFTDTPVEVYRGSITSAA<br>RKAGHIDKLILLRDKDIKDRGDRHHADAAMVTVINRSNSQVFAIREA<br>MRSAHAMTGPENWKGDFRGNSPRQEKFEFETRAAHLARIHREIDA<br>DRIPVISLRLKPECTCKVHADTIVPDYKALESEWTDKDIVRVVDNELY<br>LALVDALGGKKVLPTDKISVIDQDLAKDHRQV ALYGTSPQIPVRGGS<br>AAISDSLHIFRYVAWKDKKGAIQFGQQRVFGAEFRAMWGDPRQVDV<br>FTAPVPRWAFAHREMPKVKAAIEAGNAKQIGWYTRNDEIELDSEL<br>MAQSNVLGEFLRELPEKSWRIRGSHLSRLSLPLVLSSEGTDLSEQSRP<br>VQDAVSKGIPVSAASSILDSESMIHRGPLGIPKWNNGGNATYSFRQVAEE<br>VLGTD<br>MTNHSAGSISSTDWLVGLVDLGQRSVGLAAVALDPDGTPTTEILASNVV<br>RIDGGLLPGESESPVSRKAAAGMARRVRLIIRRRRARLKALDRRLMD<br>LGFPVDDGPETYESWLDRAVLVEGRANETERRATSKAVRIIARHIG<br>WRNPWLSWSAFELSTSDNHRNLAAAEERFDETEGWTVGQLGA<br>AGTDPRTITRPTAKDSRRIVHGEAALLEHRLVLOEDQLAELRQIWTQ<br>EWDPAELPELEKAVFTQAEFPVPPGNVGRDALPGMQTHPRAPRASLEF<br>QRFRIQSVVGNLRVPVTERSGDLRPLTPEERERTGLERWHRECHV<br>PGERPTWRDVAAEAGVSLNLRGRDTSYATATPTMETLDRLKAGI<br>AALKPAAVRRDVAAWFEAEDDQISAFVSLADSTDAESNEALDEAGLT<br>DIHGWDEAAALEKLGDLPLEPGRAAYSLESNRLTGRMQADAVDLQEA<br>RKREFGVDDSWTPTPTSIETPTGMPAVDRNLVAVRRFVMSMVSQFGM<br>PQLVVIEHVRESFLGVTAVEELRROQLDRRRRETAAKEVAAASGKEP |
| MG3 エフェクター | 11763 | MG3-95 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

【 0 6 6 7 】



【表 3 1 - 3 3】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明              | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------|-------|-----------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG15 エフェカター | 11766 | MG15-166 エフェカター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>RNPWWSFSLQEEASQEPSETFGRILERAQHEWGERVSDNATLGMIGA<br>LAANNILLRPRRYHNPKTKGNAEKLNVRGQEPILLDKVRQEDVLAEL<br>LRICKVQGIEDQYPELAHAVTQVRPVPTERYGKDP LQPMKIRASR<br>ASLETFEERDQAVANLRIRVGGSERPLTEEDYDRAVDYLMESDITP<br>PTWGEVADELEIAENTLIAPVDDVRLNVA PYDRSSAIVEAKLRKTKQA<br>RQWDDANLRLSRLILVSDATDDTARVAENSGLLLEVFESWDEE<br>KQTLQDLKFDSGRAAYSIDTLNKLNAVMEHRYGLHEARQNVFVSVD<br>TWRPPRDLDEPTQPTVDRVLTIVRRILDCERAWGRPQKIVVEIAR<br>TGLMGPSQADVLKEIARNRANERIQRELREGGIEAPNRADIRNSII<br>QDQESQCLYCGKEIGVLTAEIDHIVPRAGGSSKKRENLA AVCACNAS<br>KGSRTFAVWAGPARLRTIQRLRELQAFKTKSKKRLTAIHRRLKQRE<br>EDEPIDERSLASTSYAATSIRERLEQHFNDDLPDGFAPYSDVYGGSLTR<br>ESRRAGGIDKSMILRGQRDKNRFVRRHDAVAVMTLLNPSVAVTLEQ<br>RRMLKQENDYSSPRGQHDNGWRDFIGRGEASQSKFLHWKKTAVVLA<br>DLISEAVEQDTIPVYNPLRQPQNGSVHKDIVEAVLERTVGDSTWDKQ<br>VSRIVDPNTYIAFLSLGKKKELEADHORLVSVSAGVKLADERVQFEP<br>EEAASILTPRGVVKIGDSIHARLYGWKNQRGDHIVGMLRVFGAEFP<br>WEMRESGVKDLRVPIQGSQSYRDLAATRKFIENGQATFEGWITQ<br>DEISEAEYLATDKGDLSDFLVLPENRWKVVGIGDNRFRKIRPLLS<br>NEIPDTLNGRSIKSEERDLVSVLDKGVVYASTLLTLPSTKIIRNNLG<br>IPWRGNSHLP TSLDIQRAATQALEGRD |
| MG15 エフェカター | 11766 | MG15-166 エフェカター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>MKYIIGLDMGITSVGFASMMLDNDDEPCRIHNMGRIFEAAENPKDGSS<br>LAAPRNRSMRRRLRRKRRIKRLIHNMMTAEIDA IYNSGK<br>ELPDIVKVAEALDRKLDTEEFVRLJHLJLQRRGFKSNRKNVDAKEGS<br>EAGKLLSAVKSNNKELMVERNYRTIGEMLYKDEKFAEFKRKNADDYSN<br>TFARSEYEEIEIFRAQQEYGNPYATELKDYLEYLSQRSFDEGPGG<br>DSPYAGNQIEKMVGSC TLEPDEKRAAKATFSEYFNLLTKVNSIKVYSS<br>AGKRLNEDERKRVIKLAFAKNAISYASIRKELNLGDGERFNISYSQSD<br>KSIEIEKKTFTYLTAYHTFKKAYGSVFNEWSAEKKNHLAYALTA YK<br>NDNKKYLTENGFBDAVETDIALTLPSFSKWCNLSKALNKIIPYLEQG<br>MLYHDACTAAGYNFKADDTDKRMVLP AHEKEAPELGIDITNPVRRAI<br>SQTIKVNAIREMGESPCFVNIELARELSKNAERSKIEKGQKENQAR<br>NDRIMERLNEFGLSPTGQDLIKLWEEQDGICPYSLAKPIENLFD<br>VGYTDIDHIIPYLSLSDDTYNNKVLVMSENROKGNRIPMQYLDGKRR<br>DDFWLVVWSSNLSRRKKQNLKLTLSDDDLSGFKKRNLDQTQYLSRF<br>MLNYLKKYLTIVAPNATGRKNTQAVNGAVTSYMRKRWGQKYREDG<br>DTHHAVDAVITSCVTAGMTKRISYAKYKETEYQN PETGEYFDVNKNT<br>GEVINRFPMPYAWFRNELLMRCSDEPSPRILJHEMLPNYATDEAVAPIFV<br>SRMPKHKVRCSAHKETIROSEEDGKKFTVSKTPLTDLKLKNGEENY                                                                                                                             |

【 0 6 6 9 】

【表 3 1 - 3 4】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明              | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------|-------|-----------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG15 エフェクター | 11767 | MG15-191 エフェクター | タンパク質 | 未知 | WO 2023/028348<br>FNPESDVLNALKERLIAFGGDAKKAFAEPTFIKPKSDGSEGLVKKV<br>KLICKSTLTVPVLTNTAVADNGSMVRVDVFEVEGEGYVLYPIYVSDTV<br>KKELPNKAIVAHKPYEWEKEMREENYVFSLYQNDLIGIKLKKEMKFS<br>LVQKNSTLPKNINVKDGLFYKGTNIGSANISVINNDNTYTVESLGVKR<br>IPVIEKYQVDVLGNVSKYGEKRVFQ*<br>MKYIIGLDMGSSVGFATMMLNEKDEPCRIIMHIGSRIFEAAEHPKDGSG<br>SLAAPRENRSRRRLRRKCHRKERKLNJVSNNILTADIEDITYNSGK<br>DLTDYQIRAESLDRKLNTEEFVRLIHLISQRRGFSKNRVDAKEKGSE<br>AGKLLSAVNSNKMELMTEKNYRTIGEMLYKDDKFVAFKRNKADDTYNT<br>FAREYEEIEQKIFSAAQGEYGNQYATDELKEGYLEIYLSQRSFDEGPGG<br>NSKYAGDQIEKMVGFTLEPDEKRAAKATYSEFYENLITKVNSEKILS<br>AEGKRSLENERQKIKLAFNKNASYSASLRKELSVGYSERFNISYSQSD<br>KSIDIEKTKFTYLTAYHTFKKAYGSALJEWSTEEKNHILAYALTAYK<br>NDNKKNCLEHGFNETECEIALTLPSFSKWGNLSEKALNKIIPYLEQG<br>MLYHIDACTAAGYNYKADDTDKRMVLPAAHEKEAPELENISNPVRRVAV<br>SQTUKVINAUREIGESPCFVNIELARELSKNKTERNKIEKGQKQDNQARN<br>DRIMERLNEFGLISPTGQDLIKLKLWEEQDGCIPYSLQASIERLFEAG<br>YTDIDHIPYSISFDDTYNNKVLVMSSENROKGNRIPMQYLQGRRDEF<br>WLWVDSSNLSRRKKQNLKETLSDDDLSGFKKRNLODTQYLSRFMLN<br>YLKKYLKLPNATGRKNTIQAVNGAVTSYMRKRWGQKQVRENGDTH<br>HAYDAAVISCVTAGMTKRISYAKYTEYQYPENGEYFDVDKRTGE<br>VINRFPMPYPWFNELLMRCSNPRILOEMPLPNYAADAEAVDPFVSR<br>MPKHKAKGSAHKETIRKAFFEDGKKYTVSKVPLEDLKLNGEENYF<br>NPKSDTLNALKSRLEFCGDAKKAFAEFPYKPSDGSKGPLVKKVKI<br>VNKATLTVPVLTNTAVADNGSMVRVDVFEVEGEGYVLYPIYVADTVK<br>KELPQKAILANKTYENWKEMKEENFVFSLPNDLIRIKSKKEMKFNLY<br>NKESTLAPHYQSKDAVYVYKGSDISTAATITHDNTYKLRGLGVKTL<br>AIEKYQVDVLGNIKIGREKRMFR*<br>MNYRLGLDGTTSVGWAVLEHDSSEEPRIADLGVRIEDRAEHPKDGSA<br>LALPRREARSSRRRRIRRHRLERIKALLESQGITIEKLQEVYHGSKE<br>TDIYELRCLGLDNLTTQEEWARYLHLAQRRGFKSNRKEKENKKEK<br>NEDGKLLAAVRDNQALMQEKNYRTIGEMFYRDDKFSLNKRNSSELYS<br>HTVGREQLDEJAQLFTAQRRLGNSYAGEKVEQLYTDIVSRQSFDEGP<br>GTPSPVAGNLIERMRGKCTEEKPEPRAAKACYSFELENLLQKINSLRID<br>DKNSASPLNKEERQLIQSAHEKADIKYTDLRKKLQLSPEQRFTLSY<br>GRDDVEEIEKKKNFYLKAYHDRIALDKVSKGRKQLPVEHDMIGEI<br>LTLYKNEDRITSKLRTGLTEYDIEELLSLSYSGFGRSLKAIKNILPYL<br>QEGHIIYSEASTLAGYNFRGHDNVVKQMYLPANNEQLQDITNPVVRRA<br>VSQTIKVINAVIRKYGSPQLICIELSREMGKNFTFDRKRIEKQIKENTDLN    |
| MG15 エフェクター | 11768 | MG15-193 エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755<br>FNPESDVLNALKERLIAFGGDAKKAFAEPTFIKPKSDGSEGLVKKV<br>KLICKSTLTVPVLTNTAVADNGSMVRVDVFEVEGEGYVLYPIYVSDTV<br>KKELPNKAIVAHKPYEWEKEMREENYVFSLYQNDLIGIKLKKEMKFS<br>LVQKNSTLPKNINVKDGLFYKGTNIGSANISVINNDNTYTVESLGVKR<br>IPVIEKYQVDVLGNVSKYGEKRVFQ*<br>MKYIIGLDMGSSVGFATMMLNEKDEPCRIIMHIGSRIFEAAEHPKDGSG<br>SLAAPRENRSRRRLRRKCHRKERKLNJVSNNILTADIEDITYNSGK<br>DLTDYQIRAESLDRKLNTEEFVRLIHLISQRRGFSKNRVDAKEKGSE<br>AGKLLSAVNSNKMELMTEKNYRTIGEMLYKDDKFVAFKRNKADDTYNT<br>FAREYEEIEQKIFSAAQGEYGNQYATDELKEGYLEIYLSQRSFDEGPGG<br>NSKYAGDQIEKMVGFTLEPDEKRAAKATYSEFYENLITKVNSEKILS<br>AEGKRSLENERQKIKLAFNKNASYSASLRKELSVGYSERFNISYSQSD<br>KSIDIEKTKFTYLTAYHTFKKAYGSALJEWSTEEKNHILAYALTAYK<br>NDNKKNCLEHGFNETECEIALTLPSFSKWGNLSEKALNKIIPYLEQG<br>MLYHIDACTAAGYNYKADDTDKRMVLPAAHEKEAPELENISNPVRRVAV<br>SQTUKVINAUREIGESPCFVNIELARELSKNKTERNKIEKGQKQDNQARN<br>DRIMERLNEFGLISPTGQDLIKLKLWEEQDGCIPYSLQASIERLFEAG<br>YTDIDHIPYSISFDDTYNNKVLVMSSENROKGNRIPMQYLQGRRDEF<br>WLWVDSSNLSRRKKQNLKETLSDDDLSGFKKRNLODTQYLSRFMLN<br>YLKKYLKLPNATGRKNTIQAVNGAVTSYMRKRWGQKQVRENGDTH<br>HAYDAAVISCVTAGMTKRISYAKYTEYQYPENGEYFDVDKRTGE<br>VINRFPMPYPWFNELLMRCSNPRILOEMPLPNYAADAEAVDPFVSR<br>MPKHKAKGSAHKETIRKAFFEDGKKYTVSKVPLEDLKLNGEENYF<br>NPKSDTLNALKSRLEFCGDAKKAFAEFPYKPSDGSKGPLVKKVKI<br>VNKATLTVPVLTNTAVADNGSMVRVDVFEVEGEGYVLYPIYVADTVK<br>KELPQKAILANKTYENWKEMKEENFVFSLPNDLIRIKSKKEMKFNLY<br>NKESTLAPHYQSKDAVYVYKGSDISTAATITHDNTYKLRGLGVKTL<br>AIEKYQVDVLGNIKIGREKRMFR*<br>MNYRLGLDGTTSVGWAVLEHDSSEEPRIADLGVRIEDRAEHPKDGSA<br>LALPRREARSSRRRRIRRHRLERIKALLESQGITIEKLQEVYHGSKE<br>TDIYELRCLGLDNLTTQEEWARYLHLAQRRGFKSNRKEKENKKEK<br>NEDGKLLAAVRDNQALMQEKNYRTIGEMFYRDDKFSLNKRNSSELYS<br>HTVGREQLDEJAQLFTAQRRLGNSYAGEKVEQLYTDIVSRQSFDEGP<br>GTPSPVAGNLIERMRGKCTEEKPEPRAAKACYSFELENLLQKINSLRID<br>DKNSASPLNKEERQLIQSAHEKADIKYTDLRKKLQLSPEQRFTLSY<br>GRDDVEEIEKKKNFYLKAYHDRIALDKVSKGRKQLPVEHDMIGEI<br>LTLYKNEDRITSKLRTGLTEYDIEELLSLSYSGFGRSLKAIKNILPYL<br>QEGHIIYSEASTLAGYNFRGHDNVVKQMYLPANNEQLQDITNPVVRRA<br>VSQTIKVINAVIRKYGSPQLICIELSREMGKNFTFDRKRIEKQIKENTDLN |

【 0 6 7 0 】

【表 3 1 - 3 5】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明              | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------|-------|-----------------|-------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG15 エフェクター | 11769 | MG15-195 エフェクター | タンパク質 | 未知 | DAVRNKHIEYGHILNPTGLDIVKMKLWQEQDGRCAYSGEPIQDLFDA<br>GLADYDHIPYSVSFDDSYANKVLVKSSNRQKGNLLPLEYMKNNPNKQ<br>EKFYVYVNTNRNFRKQRLIKKTTTEEDRNKWKERQLNDTKYISRF<br>MLNYRDLLEFAPAEANGIKRKVISVNGITAYMRKRWGLKKDRLAGD<br>LHHAQDAVVVACVTEGMIQITRYSQYCEAKNNRSHFVYETGEVIDT<br>LRNRFGADFEVPEWDFNFKIEMVSRSLDDPALRIDAYKLDNYLDLKDIP<br>FISRMNKNKGAAHQETIRSRLLGEGLYVSKNITIKLKLADAGEIAN<br>YYPKSDMRLYNALKNRLQQFNGNGEAAFEKPVYKPAAPGKTISPVK<br>KVVIDKSNLVAVGKVAANGDMLRIDVFKKGDGYVWVPIYVADTV<br>KETLPNKAACHSPYELWKEMDNDNDFISLYPNDLIRFIPNNGEEAFM<br>YYKAGISTASITVESIHRSQSIPSLGYKTLKILEKWNVDVGNRTLYKN<br>EKQYYPGQTTR*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| MG15 エフェクター | 11770 | MG15-217 エフェクター | タンパク質 | 未知 | MKYGIGLDIGIASVGSAILVLDGSDPEYKIYRLSSRVFPKAEITDKGESLA<br>SDRRNNGMRRLRRRRHRRIRNLIVDYVDVFNEDYITEIYAESGLK<br>DIYQIRYEALDRKLDKDEFIRLLHLSQRKGFKSNRKSVDVKKDDGKLL<br>DAVKKNTLRQKMYRTIGEMLYCDDRFAADSKRNTTEGNYKNTFSRSEY<br>GEEKCIFENQRAFGNEYATEDEEFKFIHMSQRSFDEGPGPKDSKYS<br>GNLIERLVGKCTTEREEMRAPKASYTFEYFNLLSKINAIVKIVSANNTRC<br>LTEQRAIKNLAFSKNDLSYKSLRKALGLNEDELFNISTDSDTNKKK<br>AKNKGTAADKTSERDAVEDTKFSYLKAYHTFKKAYGDEYDRWSTD<br>KKNYLGYVLTVFKTDKNVELKLERNESDDEINIAQTIPFSKLGNLV<br>KAMNKMIPFLENGEIYNKAAEMAGYNFKADDKAGMYLPANESKAPE<br>LGDIANPVVRRVSQTIKVINAIIVREMGESPVVYVNIELARDLAKSHDER<br>EKIEKNANRQKNDKLMEELRKEFKLANPKGEDLIKLLWNEQNGR<br>CMYSYEPVIRERLFEFGYAEIDHIIPYSISFDDTMSNKVLVKAENRDK<br>GDRPLQYMTCKKADDFRVRVSNLSRKKNNLLKEQLTEEDRKSF<br>KQNLQDTQYISREMNMFIRKYLKFAEAKIVAVNGRAIDYMRKW<br>GIRKIRADGDTTHAYDACVACATHGMVQRISEYSKYKETEYIDDDGR<br>IYDINKKTGELTDTRFPMIPYPMFRKELEMLTSDNPQRILSQSKFPNYSGD<br>EQLEPIFVSRMPQHKVTGAHEDTLRKPVTENGQNYVVOVKVLTCLK<br>LNDNGEIEYNYMPQSDKLLYNALKERLAEYGGDGGEKAFKNLTFPRK<br>PKSDGTPGPVITKVTKTEKQTCGVPLADNTTIADNGPMVRVDVYVAG<br>EGYVLVPIYVSDTVKKELPNRACVANKPYSEWVVMDDKNFLSLYNN<br>DLVKITFKREKKSIVNKKDSTLDKEHRTKSELVYKCTNHTASITVT<br>HDNTYIFEGMGVKTLSIEKEYVDVLRVRKVNKEKRMGF*<br>MRYVLGLDIGIASVGSAILVLDGSDPEYKIYRLSSRVFPKAEITDKGESLA<br>AKPRREARGNRRRLRRRRHRRIRNLIVDYVDVFNEDYITEIYAESGLK<br>DKDVYTLRAEGLDRSLAAEWTRVLIHAKHGRGFKSNRKSSTVAGEDG<br>KVLQAVKENQELSKYRTVGEFMHNDDEKFSRKRNTTDSYILCVSRH |

【0 6 7 1】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 3 6】

| カテゴリー       | 配列番号  | 説明              | タイプ   | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------|-------|-----------------|-------|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG15 エフェクター | 11771 | MG15-218 エフェクター | タンパク質 | 未知 | MLKDEIKALFTAQRSFNPNFTDEKFEAKYIEFESQRAFDDEGPSESYPG<br>GNOIEKMIGQCTFEDGEKRAPKASYSMRNFNLQKVNHIHRIKSSATRA<br>LSEERSIHIALAYKSPNFTYGSIRKAIKL PYDMTTSBVYKYKGLSEE<br>ELIDKNEKSKJSLPEYHITIKALDKVYKRNIEELEDNINDIAYAFSV<br>YKTNAKISQKLKECGIDNKDIEALNNLGTFAFGHLSYKACKKINKYL<br>ETGMTYDKACEAAGYDFKGCEKTFLSGAADKEIKEPNVPVKRALSL<br>QTIKVINAVVRKYGSPVEHVHVELAREMARSKKDRDKINSIMKDNQAA<br>DRIRGLKNEFNINPTGIDILKYRLYQEQQGCYVYSQKVMLERYMK<br>DGKYAEIDHILPYRSFDDSYNNKYLAKTEENRLKRNRTPYEYMQDNE<br>VKYKGFCEIVKSHINPTKVSNNLRENNYNPQLVKDWKARNINDTRYISK<br>FVYNFLNDHILLADGMRKRRIIANGAVTGYIRKRLGINKRANGDTH<br>HAYDAVVIACVTQGVISKYTKYQWQEVYKNNNTGKLVDTYETGEHT<br>KDNFDEFIDSKTFEPWPLFRKELEARAGTNPKEIECLRLDTYSPEVT<br>SLRPMFVSRMPNRKVGTGAHQETIRSSRMANDGMTYSKYVPLTSLKLS<br>KDGQSEGYFSPESDRLLYALLNRLQGGGKADKAFTEPFYKPKNDG<br>SKGPV/KAVKITAFSTLNVRRNCKGLADNGSMVRIDVFHITAGKGAGY<br>YLVPIVYADTKKDKLPKSAIVAHKKYDEWKLMDKEDFVTSLYPNDLIY<br>VEKKGNIELSLDKKIEKDSLTPKISSPQGYFYVYKAGIDGDSVQIKSH<br>DGVYLLPSMGVKTLLKLRKCVVDELGNISFYGKEKRQHIF<br>MNSVKFGLGLDVGIASIGWATVALDEKGEYPYKLLNLGSRFEDKAENP<br>KDGSSLAMQRRQFRSQRRLRRRRHRLDRVFLFKIGLCTNDELNKL<br>FQTPAPKNVYELRVDALDRKLDKQEWIRVLYSVLKIRGFKSNRKNKAK<br>SEGLLLKAIQSNIEEIFFNGYRIVGEMLFKDPFTNSKRNGGSGYKNC<br>VSRISIQKELDLLEKQREYGNFTSDYFKESFLNIHLAQRNFEDEGPAP<br>SCYGGNLEKMICYCALKKDKRAPKASLSFALFSWSKINNIRYYDSN<br>RCKEYSISTEQARKVQLIKSLDLYSDIRKIHGLDDGCYFKDITYTSK<br>KSKKTKKQQAKNNESYLSIDGLTLVEDVLTPEKDANEQSVDTILIE<br>KRSKIKFNFISIKKAAANGMLDHLNPFDPEDRKIFNRISYAFVYSKNDD<br>GIAGYLNEIDISAEIKESLNNLDGFSQFGHISEEACEKLLPLENGCDYT<br>SACVEAGYVSSDDVVGKDLLPARSSELDDIVNPVVRRSYQLIKVVNSI<br>IRENGKPEYINVEFARDLARSFADRETTKEQEDRKAHINEKYRKHIEET<br>FGRARASSKDILYKLWMEQSKCYSGKIHDAHRLFEPGYVEVDHILP<br>FSKSFDSMTNKLVTKEENQNKANRTPLEYMRASKPMYVDSYLAMIV<br>KFYKSNFKKLQNLTTTEFCGNDREWSTSNLNDTRYIAKFIHKYIKDH<br>LYPAKTGIKRVAVNGRITSLRHFWGIRKIRENGDLHHAVIDAAVIV<br>TIDMIKKFSEASKRHEEYDEKIMVEKPWEMFVDEISARISENPADQVE<br>RLGLSTYSDEEKSSLKTFFVSRMPRHKVTGSHDSTLRSPVLLKQGINA<br>YVSKREINDKLLKVFDDBKKCEFNQDLDAKYASLSKSYLEDKNEKNG<br>EFTIKIKDGSGLGPVVRKYVVENCSGGVFLNNGKAFKNGDMIRIDVT |

【 0 6 7 2 】

【表 3 1 - 3 7】

| カテゴリ              | 配列番号  | 説明                     | タイプ          | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|-------|------------------------|--------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MG15 エフェクター       | 11772 | MG15-219 エフェクター        | タンパク質        | 未知 | QVKEGDKGFYFVPIYVADKVKDKLPSRAVIQKDKPKDWKEMKDEDE<br>IYSLYPNDLIYESSKKIVGFKNNKSSSEILGYVDMSEGYLYYTGADISTASI<br>NVDVDSSEKHGLGVKTKITLDFVGNHIEVKKEKRLVFGRRK<br>MNYILGLDIGIASVGAVALDANDEPKDLDLNARFEAAEQPKTGAS<br>LAAPRREARGSRRTRRRRRIIRHILFARELIJSAENIAALFEAPA<br>DYYRLRAEGLSRRLDEGEWARVLYHIAKRRGFKSNRKGAAADAEK<br>VLEAVKENEALLKNYKTVGENMFRDEKQIAKRNKGGSYTFCVSRG<br>MLAEELGELFAAQREQGNPHASETTEAYSKIFADQRSFDDGPDNSRS<br>PVAGNQIEKMIGTCSLETDPPPEKRAAKASYSENFESILQKINHRLKD<br>AKGERPLTDERAAVEALAWKPSLTYGAIRKALPLDELRFIDLYY<br>RWDDKKEEIEKKLPFAAPYHEIRKALDKREKGRIQSLTPDALDAVGY<br>AFTVFNDAKIEAALSAAGIDGEDAVMAAGLTFRGFGHISVKACRK<br>LPHLEKGMTYDKACEAGYDLQKTGGEKTLKSGNLDIEIREIPNVV<br>RRAIAQTVKVNNAVIRRYGSPVAVNVELAREMGRITQERRDMKSMIE<br>DNNAENKKEELKGYGVHPSGLDIVKLYKEQGGVCAYSLAAMP<br>IEKVLKDHVYAEVDHILPYSRSDDSYANKVLVLSKENRDKGNRTPE<br>YMANMPGRRHDTTWVKSAVNPRKRDNLLEKFGEDKEAAWKEHII<br>LTDKYGISFIANLLRDHLEFAPWNGKKQKQHLVAVNGAVTDYTRKR<br>LGIRKIREDDGLHHAVIDAAVIATVTCQNIQKLTDSYQIERAFVKNRD<br>GRYVNPDTGEVYLKDEWIVQRSRHFPEPWGFRHELEARYSDHPKEM<br>IESRLPTYTPEIDGLKPPFVSKMPTKRVGAHLETVVSPRLKDEGM<br>IVKKVSLDALKLTCKDKDAIENYYAPESDHLLYEALLHRLQAFGGGGEK<br>AFASFHKPKADGTPGPVVKVKIAEKSTLSVPVHHGRGLAANGGMV<br>RVDTFTEGKDRGYLYVPVYTSVVRGELPMRAVVQKSYAEWKLIM<br>REEDFESLYPNDAVIEHEKGVKVKIQKKLREISTLPREKMTSGLEY<br>YRTMGIAVASIHIYAPDGVYVQESLGVKTLKEFKKWTIDILGGEHPV<br>QKEKRODFASYKRDPIAAKSTSSG<br>HGDVLTATIPASTSFRNTPATLRKLLAGEAVSVGWLTQNDIEIEVD<br>EFAGNLSFAKFLTEPEKRWVVDGFVNNRRLRIRPAYLSAELTDNHS<br>KVVHETLEKGGQFVNAGALLSASRTLIRRTALGAPRWKLDSSGLPVSF<br>SPLKLAEEAL<br>(N22)<br>GTTGGGAATCGTCACTGAAAAAGTGACGATTCTCAACAAAAAGACTTT<br>TGTCTTGATTCTTTATATCCCGGCATTTTGTGCGGGGATTCGTT<br>ATT<br>GCATCGTTTGAAGAAAGTGACGATTCTCAACAAAAAGACTTTGTCTT<br>GATTCTTTATCCCGGCATTTTGTGCGGGGATTCGTTATT<br>MATKKILGLDLGINSIGWALIEEDSNPKSILAMGSRIVPLSTDDSTQFA<br>KGQAATKNADRTQKRTARKGLNRYQMRRAMLTELRRHIGMLPERTID |
| MG3 エフェクター        | 11794 | MG3-42 エフェクター P I ドメイン | タンパク質        | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG3 エフェクター sgRNA  | 11795 | MG3-42 エフェクター sgRNA    | ヌクレオチド (RNA) | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG3 エフェクター Itracr | 11796 | MG3-42 エフェクター          | ヌクレオチド (RNA) | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| MG16 エフェクター       | 11797 | MG16-3 エフェクター          | タンパク質        | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

【 0 6 7 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 1 - 3 8】

| カテゴリー        | 配列番号  | 説明           | タイプ   | 生物 | 箇列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|-------|--------------|-------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              |       |              |       |    | WO 2023/028348                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|              |       |              |       |    | ENIMDLWRLRSDAAITDGKQLSLPQIGRVLVHINQKRGYKHSKADNSA<br>NTKQTKYVEAVNQRYDQACHQITGQYFYEQLLSSAVQTPSGSVYTY<br>RIKDKVLPREAVIAEFDQIMKVQRVYFVDPVLTIDELVDTLRNHHFYQRP<br>LKSKHLVSLCEFEKRPFKREDQIVSGPKCAPRTSPLAQFCTVWEA<br>VNNITLNRQNETFEITQEQRVAMADFLNQHDKMGVKDLQKILGISPK<br>DGWWAGKAGKGLKGNITFTQLREALGNLPAEHLKMKLSMYDAA<br>VDTTIGELIRQVSPQVEEPLFRLVHLVYSLQNEDELKALRKQFQID<br>DEEVLDKLCKIDFVKPGYANKSHKFIKRLLPYLMGYQYIEACAHGV<br>NIHSDSLTAEQNAARPLDKIPLLEKNELRQPVIEKILNQMINVNAKA<br>EYGDIDVRIELARELSSKDEREAAFKRNNENRQNKIYENRIREYGI<br>QPSRSRIQYKMWESNHLFCYCGKPNVITDLAGAEEFHHIPQSVL<br>FDDSYSNKVACACRACQAKGNLTAREFMEKHSKEYDSYLRRYDDAF<br>NAHRISKTRDHLWRKEDIPQDFIDRLQLSQYIAKKAELRQGYR<br>NVYATSGSVTDFLRHQWGYDEILHRLNLPYQQVEGLTEDVTDHCG<br>QEHQERIKGWTKRLDHRHHAIDALTIALTQQSVIQRINTLNSREQ<br>MDELGKRTDTPETEKRSLEKVVDAQPHFSVQVTDKVDGILVSR<br>AGKRAATPAKRAVYQNGKRHHVQTGLQVPRGALSEETVYGLGNKY<br>VVKYPLGHQSMKMDIDVPTIREVTRNLNAGGKAKDAFAEPLYSDA<br>AHQMGIKTVRCYTGLQDKAVVPRFNAQCEPVGFKMGNHHIAIYR<br>DAKQYQESVVSFWQAVERKRYGIPVIEQPHFVWDLKINSNIPQDF<br>LETLPHDDWQFVVSQNNEMFILGMDADFEAAAMEQKDYRTLKYL<br>YRVQKISSKEYCFRYHTTTSVDDKYDGVINKSISMELQKLRKLTSAFF<br>SQHPHKYRVNLLGEVSAL |
| MC86-1エフェクター | 11798 | MC86-1エフェクター | タンパク質 | 未知 | PCT/US2022/041755                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|              |       |              |       |    | MKKILFDLGTISGYSVLTDEDAQKYSLLDYGVSMEFDKPTDKDGNK<br>KLLHAQALSTKKLYKLRRKKNLALLFEKYALAKASKLLEQEKKNL<br>YMYKWQLRAKKVFEERLSIGEITILYHIAKHRYGKSLSDGDLLELC<br>VELGKIDVKEKKDDEKGIKQALSTIESLRKEYPKKTVAQHIYEVEL<br>QKERPVFRNHDNRYMIRREHINDELATIRKQKEFGNFENIDSEFVID<br>IIAADDQKESTNDMSLFGKCEYYPKEHV AHQYSLSDIFKMYQAVANI<br>TFNKEKITKEQIRLLTEDFLNKKIKGKSVKELKYKDYRKILKLDSEV<br>KIFNKEDSYQRAGKKVEHTTKHFVDNLKIDKSFIEDFNADSVYL<br>MREIFDVTHKEKSPRIYEQKSKYSSEAVIIDLIRYKKGSSLSISSYAMA<br>KFLPYFEEGMITLDAIKEKLDLGRKEDSYVKKGIKYLHISTYEKDDDL<br>EINNHPVKYVVSALRVVKHLIAKHGTFDEIKVESTRELSLNDKVKE<br>IDKANKAREKEIISNDEYQKIAKEYGKNIHKEYARKILMWEAQERED<br>VYSGKSIGIDDIFSNRVVDHIVPQSLGGLYVQHNLVLRDENLQKSN<br>QLPMNYTIDKEAYINRVEHLFSEKINWKKRKNLLASNLDIYKDTFES<br>KDLRATSYIEALTANILKRYYPFIDEKKSVDSAVRHHQGRATANIRKV<br>LGVTKRSNHHHGVDAJJIGVTNPSWLQKLSNIFRENFCKIDDEARK                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

【 0 6 7 4 】

【表 3 1 - 3 9】

| カテゴリー             | 配列番号  | 説明                    | タイプ          | 生物 | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|-------|-----------------------|--------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |       |                       |              |    | WO 2023/028348<br>NIKKALPYDGVYKDIVKEIEQKNSYGEDSIFYKDIWGWKAKTVNFW<br>VSKKPMISKVHKDTIYADKNGHFTVRESIAKFINLKITPTTFPEDFMK<br>KPHKELEKMYLYKTNNSDVICKIVQRAEEIKELLWSEFLDVKNKE<br>EMQEAKEANLESIVHRELFNNNGNVKVFYQTNLTGFKVRGGGLAT<br>KEKTFIGRAFKKDKKLEYKRIDVSNFEKIKKNSDGSFKYKNDIVFFV<br>FDEEKYKGGKIVSFLEKMAAFSPKYPANIQAOPESFITFKGKANS<br>HKQVSYGKAGHKLVYDILGNIESQVYLGNAKSKLLDEIKSVSH<br>(N20)GUUUUAAUACCCGAAAGGUUAUAAACUAGGCUACUUUA<br>GUGGUGUACUUUAGAGUAUGGUUUGGCUUAGUACUCCAUUUU<br>MRKKIRYVIGLDIGIASYGAALLDDENDNVCGIVRAGVHTFDEAVVG<br>QSKITGAAYRRGYSRGRSRRKVNRIQVKNLLQRLNISKKDLLEYF<br>SGAVENIYLRCAAIQNEPAYILNKKELAQILJIYAKHGRYKNSYSEQ<br>KTDSSKKVLSALSENKMYLEKGYQTAGEMLYRDEKFRKRYGSFE<br>CELLVNSGDDYSISISRELLVEEVHIVAFQRELGKNTTKELEDQF<br>VEIMQSQRNYDESGEGSPYGGNLEKMGVECTFEKGEKRAKASYIS<br>ERFVLEKLNHLRISQKNGDVRLTEERDAIKLAYKNKDVYKALR<br>TILKLNPDERFGGLTYSRGDIENSTEGKSVFVLEYWYEKKVLGLFYD<br>DLDNEETQQLDSIGTILTCYKSDDLRRKFEQIHLEQEKIEHLLALNY<br>TKFQNLSEKAMKNMPELEKGLSYTEACSNAGYGDKEITEGKNKYISK<br>ELLNNTLDSIMNPTVKRAVRRIRILNELIKQYGSPEVHIVEMARDLTH<br>SQIVTNMKKRQDENKAEKAEKAFHCENFGKTEAQVSGKDILRYRL<br>WKSQNDIYSNTMIPVSDILDEYKVEVDHHPYSCSFNSFNKMLVRK<br>KDNQDKNRTPYEYIGSDEKKWEAFATCANTYVMNYGKRNMLIKV<br>PASNTGEWMSRNLNDTRYTTTKVTVTLRKHLKEAYVDQRRKHIYPI<br>NGGITAKLRYEWGLEKDREKSDKHHQAQDAVVIACCTDGMQIRLSQY<br>MLQEIGIVTWKNHKLVDRTGEIVETNLPWECFEEVEMFADSP<br>DYIEKAKKNGYKGEAPKPIFVSRLPQKTTGKINEDTLRSYRDSKGA<br>RFVNTKLQDLKLVENDGKKQIKDYRPERDDKLLYDKLLERLVKND<br>AKVFAEPFYKPKKDGSDGPIVRSVKTYGKTVKNQVLGVDGVAERG<br>IYRCDVFRKDEYAVVYVYRDLVIGNLPNNAHFDIEMKKGEFESL<br>YKDDLIRFVKDGKEQYAYKYKNANNSQITYTEHDTSKETKCTTIRLTD<br>KFKQMNVDLLGNYSYSSDKEERWN*<br>PCT/US2022/041755<br>KITVKNQVLVGDGVAERGIGYRCDFVKRKRDEYAVVYVYRDLVIGNLP<br>NNAHFDIEMKKGEFESLYKDDLIRFVKDGKEQYAYKYKNANNSQI<br>TYTEHDTSKETKCTTIRLTDKIQKMNVDLLGNYSYSSDKEERWN* |
| MC86 エプエクター sgRNA | 11799 | MG86-1 エプエクター s gRN A | ヌクレオチド (RNA) | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| MC94 エプエクター       | 11800 | MC94-1 エプエクター         | タンパク質        | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| MC94 エプエクター       | 11801 | MG94-1 エプエクター P Iドメイン | タンパク質        | 未知 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

10

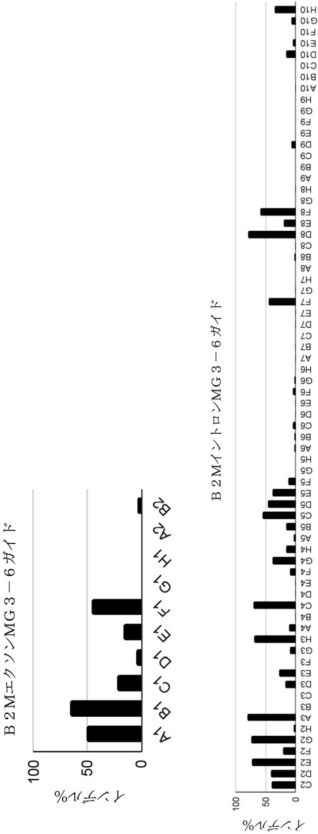
20

30

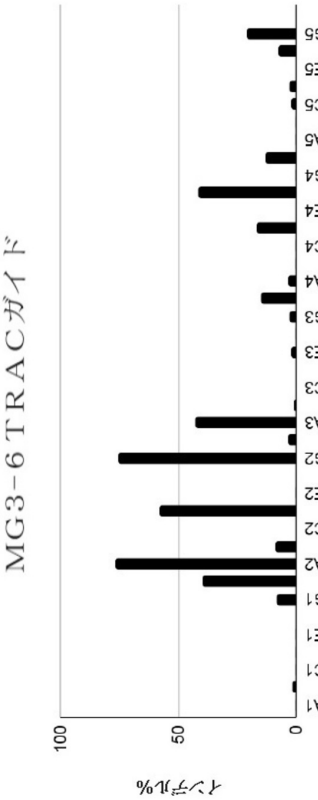
40

50

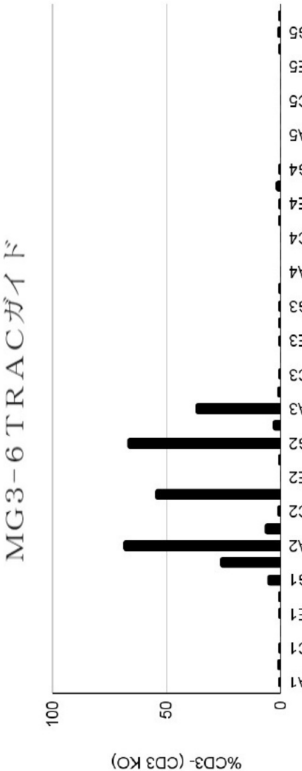
【図面】  
【図 1】



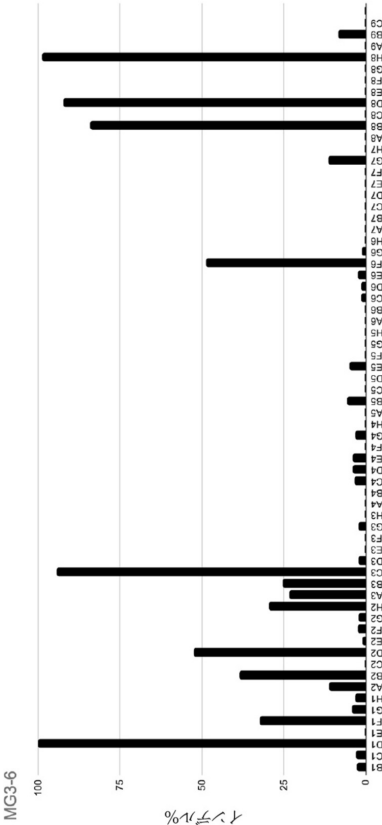
【図 2 A】



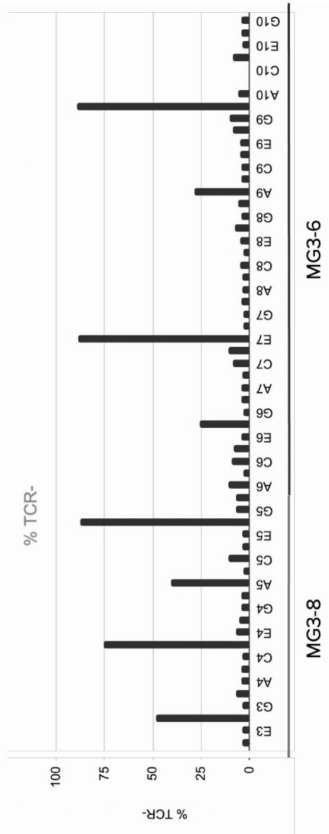
【図 2 B】



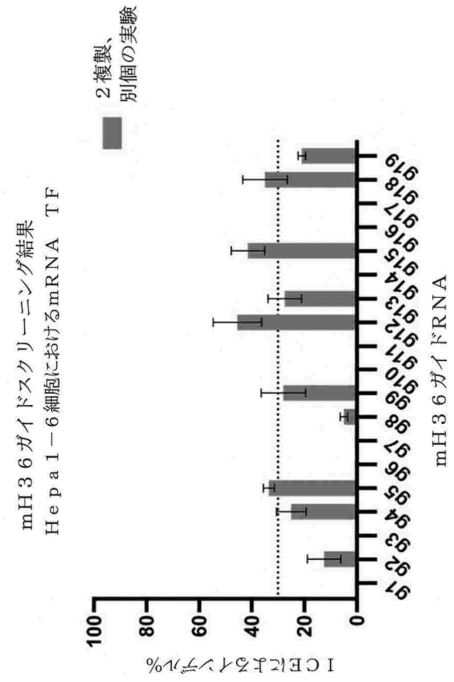
【図 3】



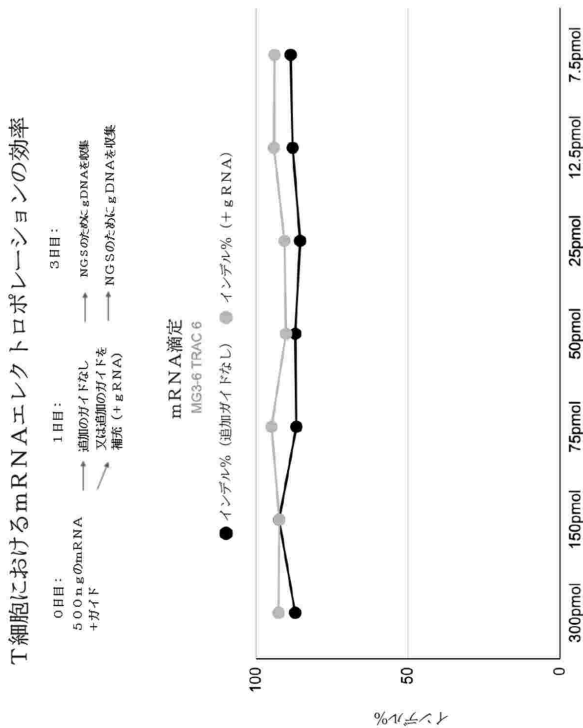
【図 4】



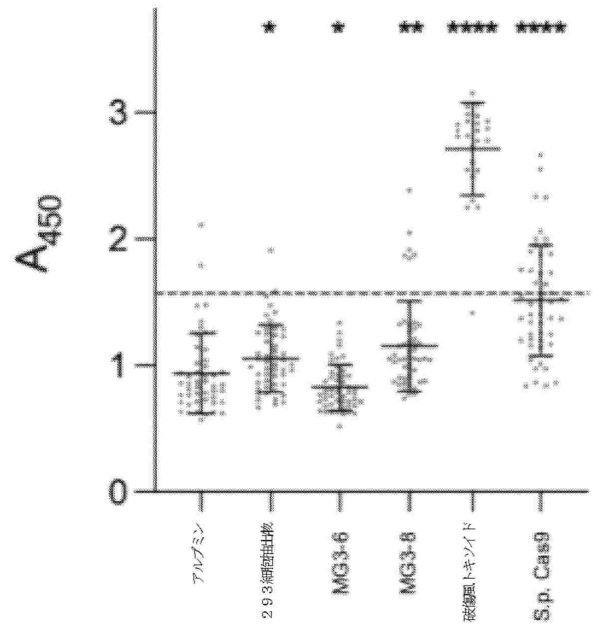
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

20

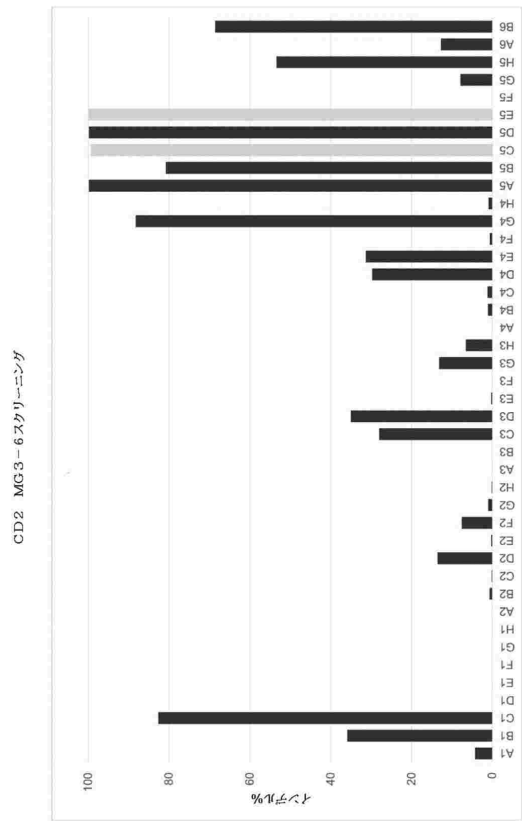
30

40

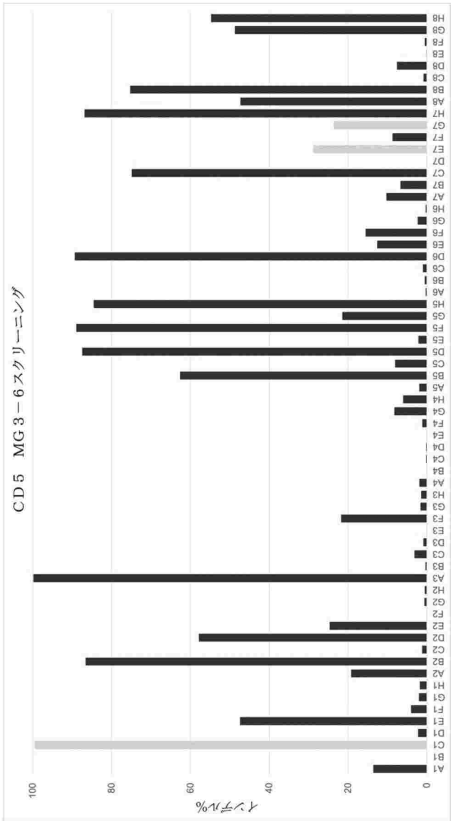
50



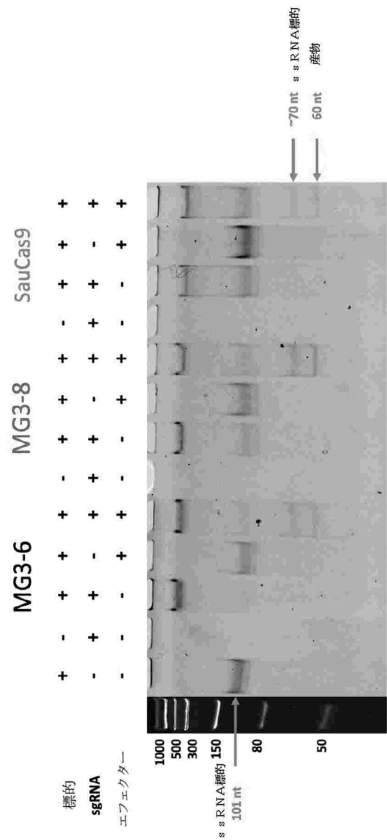
【図 1 2】



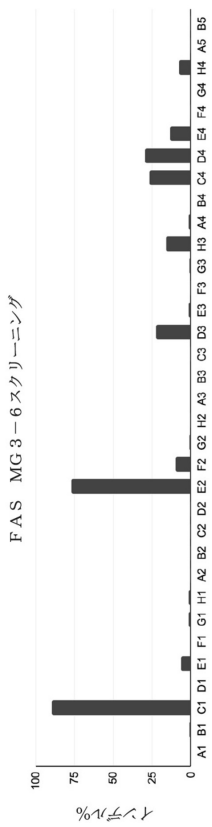
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

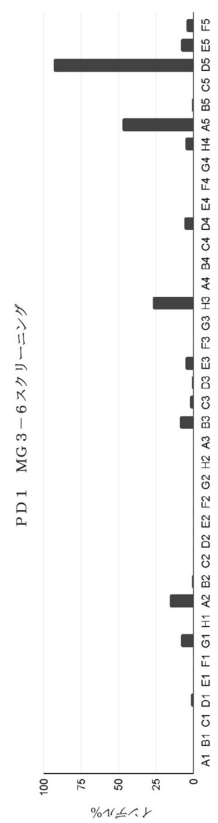
20

30

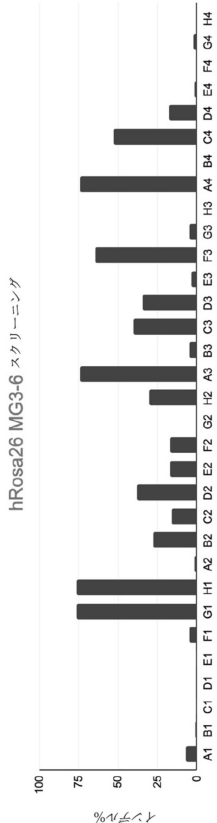
40

50

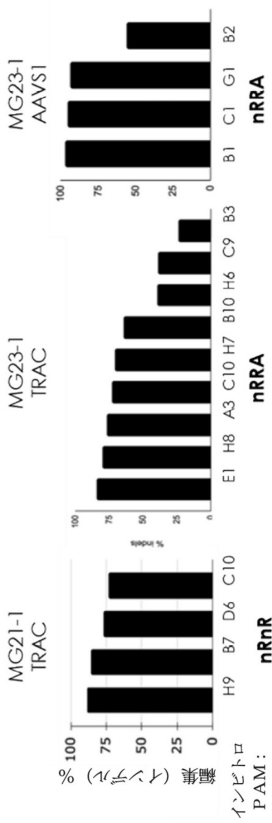
【図 1 6】



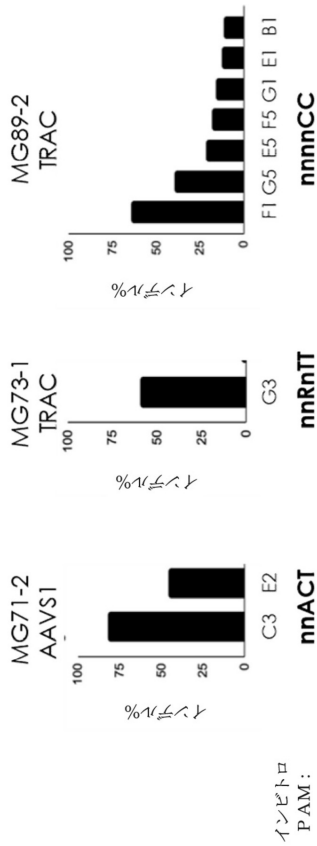
【図 1 7】



【図 1 8 - 1】



【図 1 8 - 2】



10

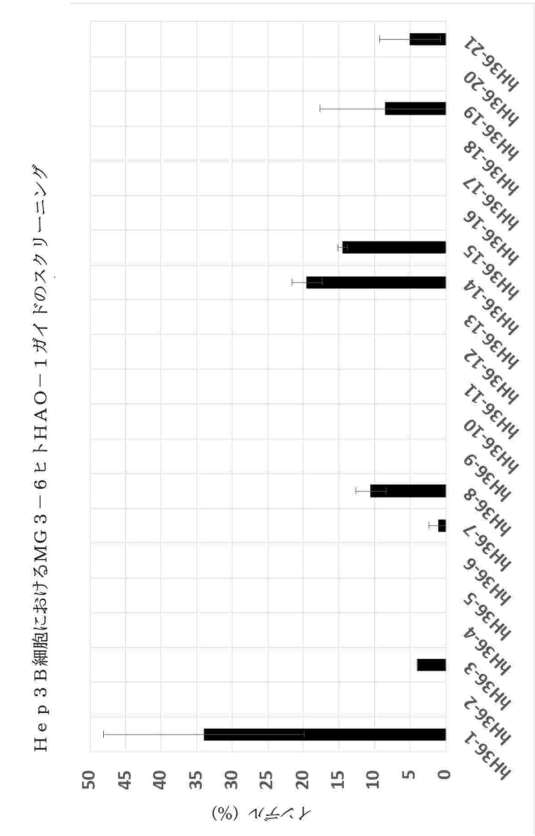
20

30

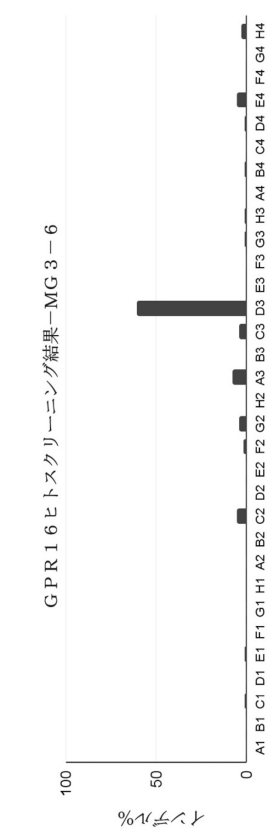
40

50

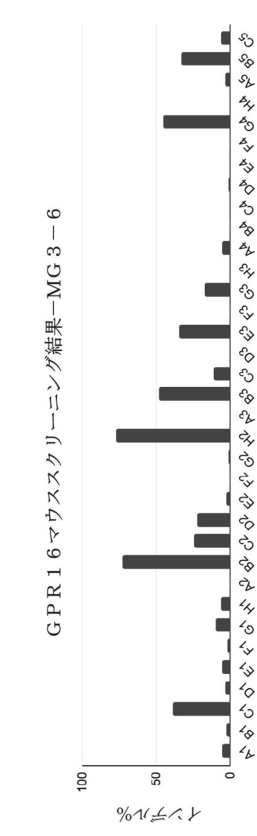
【図 19】



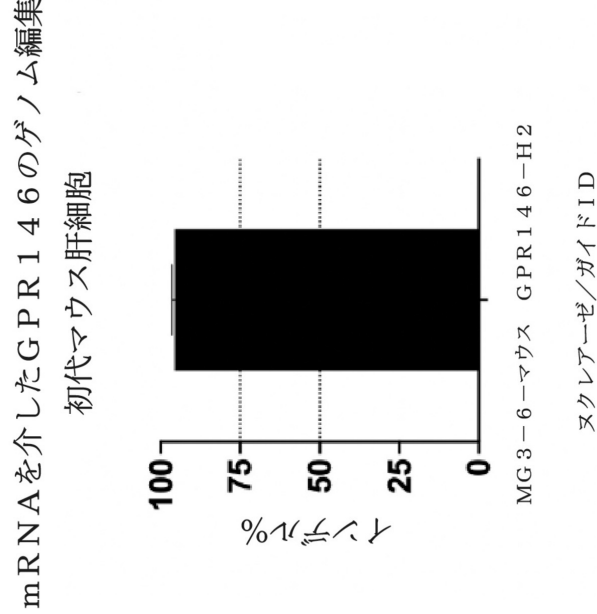
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

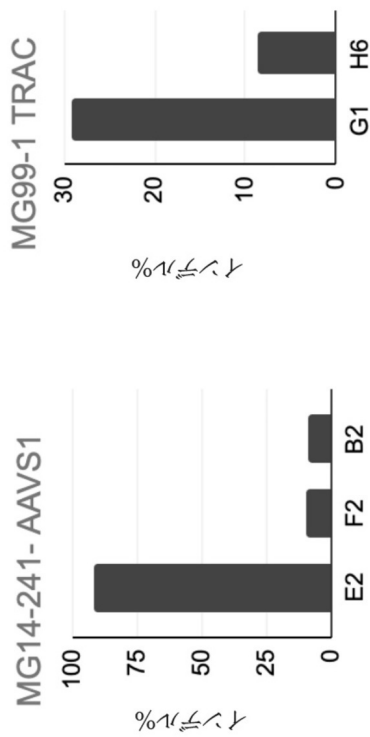
20

30

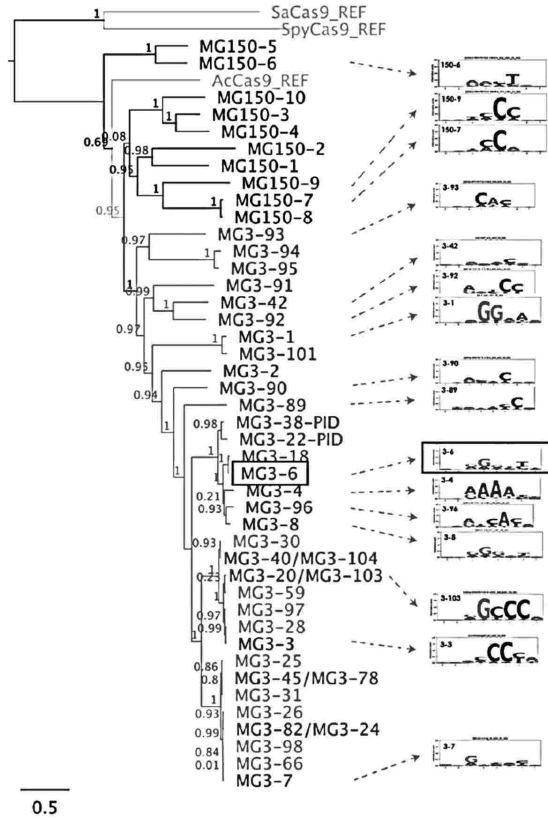
40

50

【図 2 3】



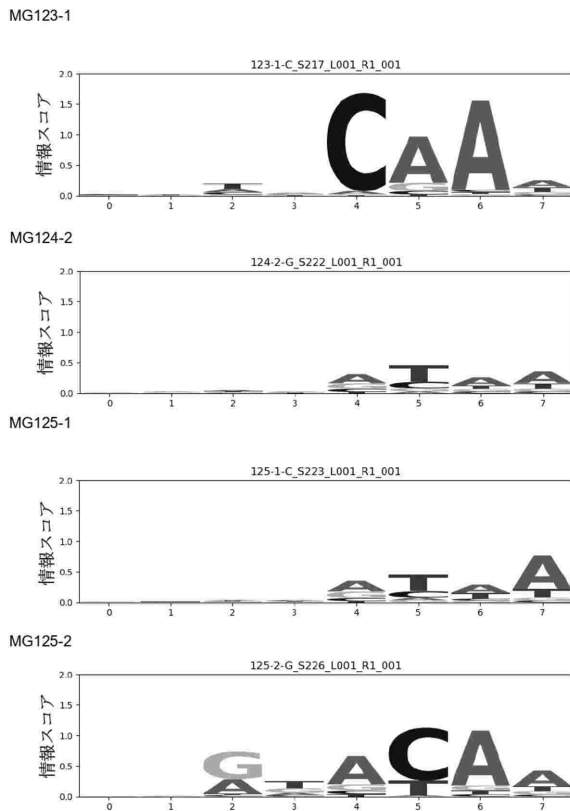
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

20

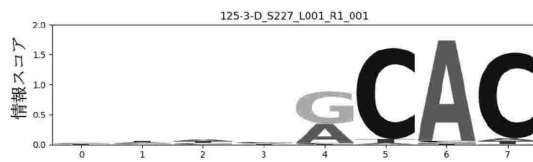
30

40

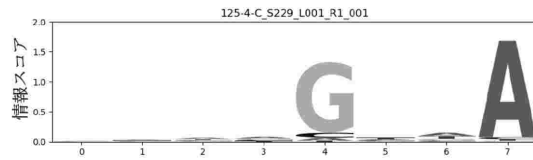
50

【図 27】

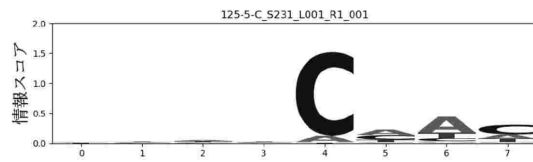
MG125-3



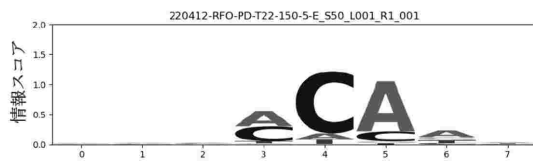
MG125-4



MG125-5

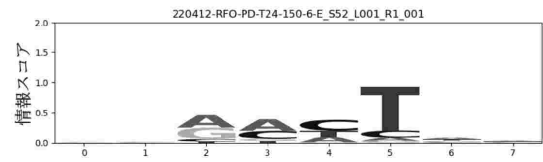


MG150-5

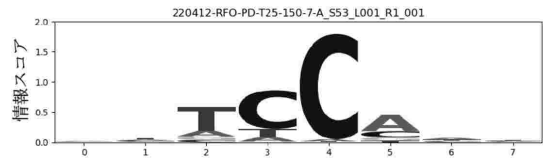


【図 28】

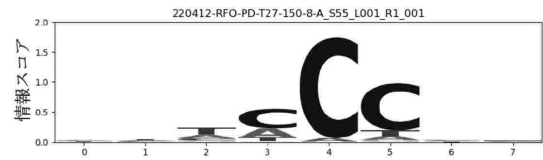
MG150-6



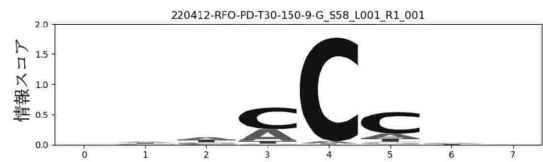
MG150-7



MG150-8



MG150-9

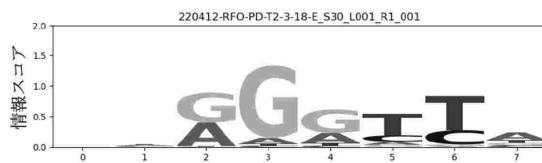


10

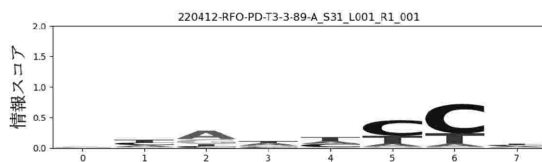
20

【図 29】

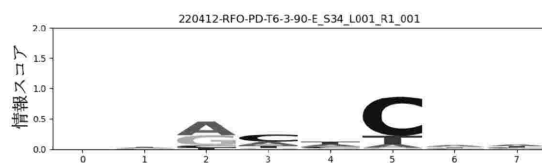
MG3-18



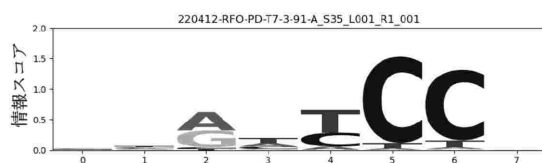
MG3-89



MG3-90

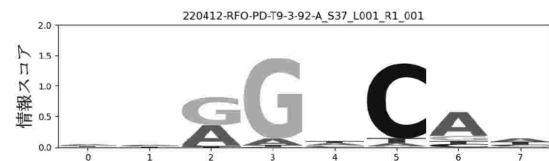


MG3-91

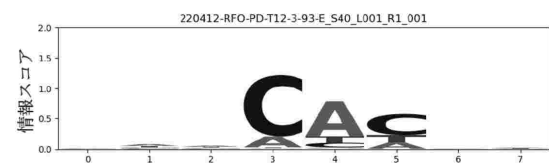


【図 30】

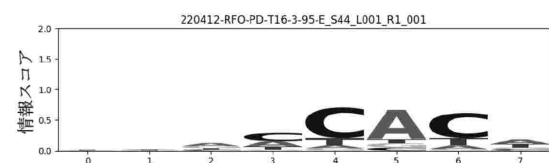
MG3-92



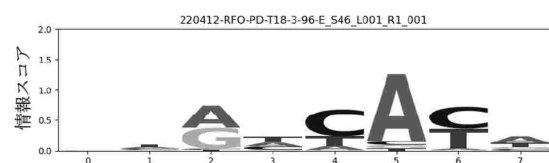
MG3-93



MG3-95



MG3-96



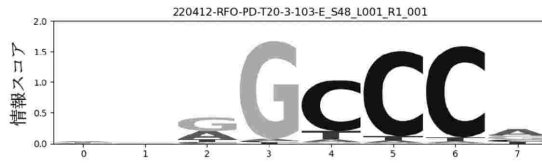
30

40

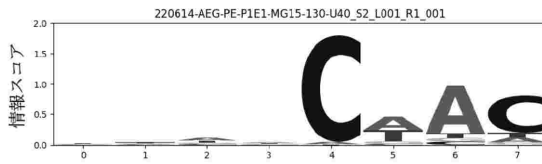
50

## 【図 3 1】

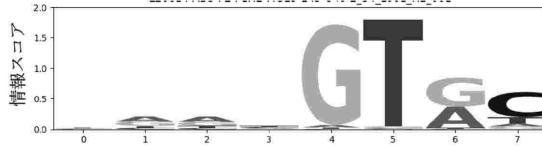
MG3-103



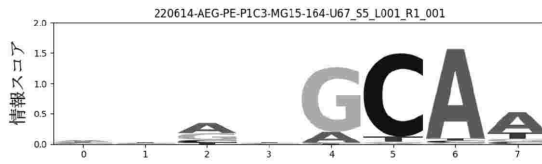
MG15-130



MG15-146

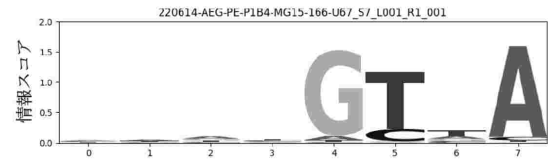


MG15-164

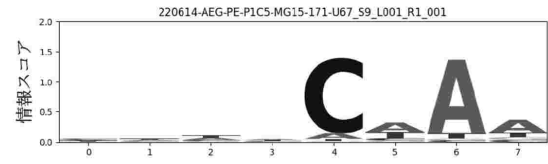


## 【図 3 2】

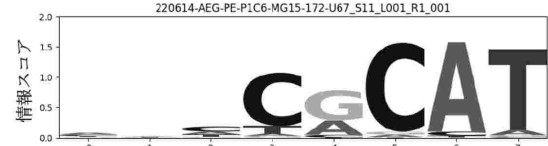
MG15-166



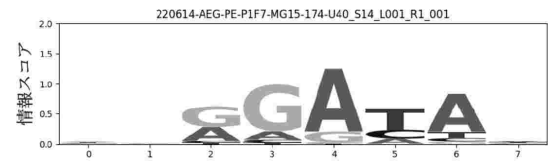
MG15-171



MG15-172

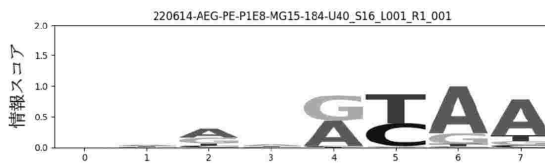


MG15-174

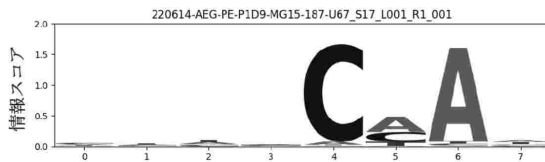


## 【図 3 3】

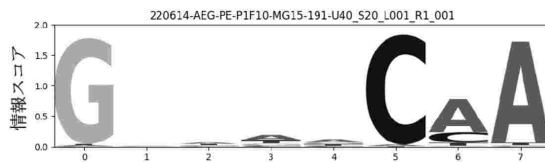
MG15-184



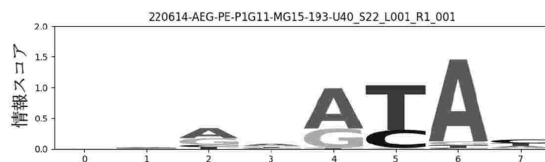
MG15-187



MG15-191

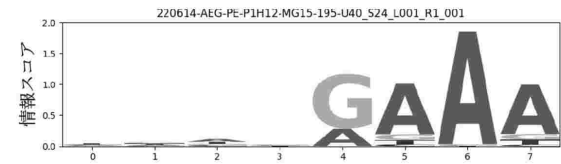


MG15-193

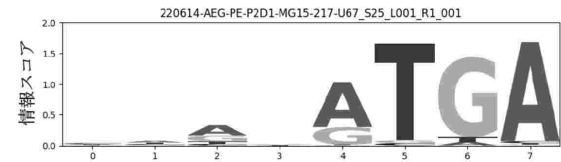


## 【図 3 4】

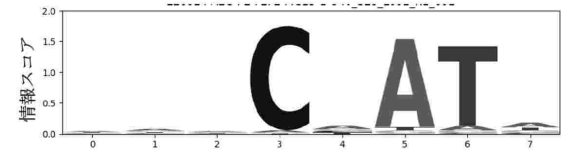
MG15-195



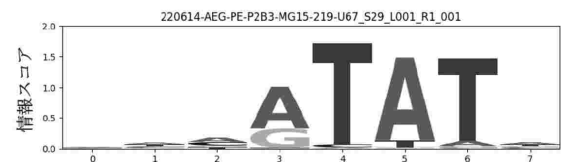
MG15-217



MG15-218



MG15-219



10

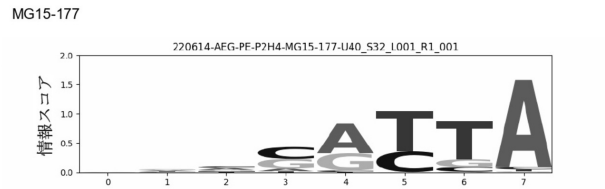
20

30

40

50

【図 3 5】



【配列表】

2024533940000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年4月12日(2024.4.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2024533940000001.xml

10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                    | International application No.<br>PCT/US2022/041755                                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/90 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| 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)<br>PATENW: IPC/CPC: C12N15/113/low, C12N15/902/low, C12N2310/20, C12N9/22, C12Y301/00.<br>PATENW, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CAPLUS: keywords endonuclease, ribonuclease, guide RNA, sgRNA, CRISPR, class 2 type II Cas, Cas9, editing, disrupt, B2M, beta-2 microglobulin, MG3, RuvCIII, RuvC, and like terms.<br>GenomeQuest: Sequence searches of SEQ ID NOs: 6305-6468, 2242 & 2244, and keyword filtering with CRISPR, cas9, gRNA, sgma, tracr, tracrRNA, b2m and like terms.<br>Google: RuvCIII, HNH.<br>DOCDB, DWPI, and IP Australia internal databases: Applicant/Inventor names searched.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No.                                                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Documents are listed in the continuation of Box C                                  |                                                                                                                                           |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"E" 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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                    |                                                                                                                                           |
| Date of the actual completion of the international search<br>2 December 2022                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                    | Date of mailing of the international search report<br>02 December 2022                                                                    |
| Name and mailing address of the ISA/AU<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA<br>Email address: pct@ipaaustralia.gov.au                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                    | Authorised officer<br>Jive Bellhouse<br>AUSTRALIAN PATENT OFFICE<br>(ISO 9001 Quality Certified Service)<br>Telephone No. +61 2 6283 2959 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                           |                                                                                                                                                                               | International application No. |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                               | PCT/US2022/041755             |
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                            | Relevant to claim No.         |
| A                                                     | JINEK, M. et al. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." Science, 2012, 337(6096):816-821, DOI: 10.1126/science.122582              |                               |
| X                                                     | US 2019/0062735 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 28 February 2019<br>see abstract, SEQ ID NO: 3155, claims 23-24 and paragraphs 44-45, 220                                          | 1-2, 6, 173                   |
| X                                                     | US 2020/0332273 A1 (METAGENOMI IP TECHNOLOGIES, LLC.) 22 October 2020<br>see abstract, pars 21, 96 & 239-241, claims 1-4, SEQ ID NOS 2242, 2244, 2249 & 5466                  | 1-6, 173                      |
| X                                                     | WO 2020/168300 A1 (EDITAS MEDICINE, INC.) 20 August 2020<br>abstract, pars 8, 90 & 164, Table 8, Examples 3-8, claim 1, SEQ ID NOS: 93 & 595                                  | 1-2, 6, 173                   |
| X                                                     | US 2019/0264232 A1 (PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC.) 29 August 2019<br>abstract, par 578, claims 1, 3, 35 & 36, and residues 681-883 of SEQ ID NO: 1040                   | 1-4, 6, 173                   |
| X                                                     | WO 2018/064594 A2 (NANTKWEST, INC.) 05 April 2018<br>pars 61-65, 69, Examples 3 & 4, SEQ ID NOS: 1-4, table in paragraph 123                                                  | 1-2, 6, 173                   |
| X                                                     | WO 2020/084580 A1 (NOVARTIS AG & INTELLIA THERAPEUTICS, INC.) 30 April 2020<br>abstract, claim 13, SEQ ID NO: 39                                                              | 1-2, 6, 173                   |
| X                                                     | EP 3699268 A1 (CHONGQING PRECISION BIOTECH COMPANY LIMITED) 26 August 2020<br>abstract, claims 4, 6-7, SEQ ID NO: 41                                                          | 1-2, 6, 173                   |
| X                                                     | WO 2016/160721 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 06 October 2016<br>abstract, example 2, claims 16-17, 23-24, 35, 38, 65, 68-69, SEQ ID NOS: 12311, 12545 & 12568 | 1-2, 6, 173                   |
| P,X                                                   | WO 2022/159758 A1 (METAGENOMI, INC.) 28 July 2022<br>SEQ ID NOS: 9-12, 26-27, 103, 108, 159-210, 603-604, pars 17, 50, 52, 74-75, examples 12 & 14, claims 18, 46-51          | 1-5, 173                      |
| P,X                                                   | WO 2022/132765 A1 (EMENDOBIO, INC.) 23 June 2022<br>abstract, examples 1-2, claim 1, SEQ ID NO:s 1315, 187, 1066, 205, 224, 1298, 1147, 1484                                  | 1-2, 173                      |
| Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)            |                                                                                                                                                                               |                               |

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|                                                           |
|-----------------------------------------------------------|
| International application No.<br><b>PCT/US2022/041755</b> |
|-----------------------------------------------------------|

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
  - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13<sup>ter</sup>.1(a)).  
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:  
Sequences searched were SEQ ID NOs: 6305-6468, 2242 and 2244.

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/US2022/041755****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:  
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☒ Claims Nos.: 52, 55, 64, 67, 78, 80, 89, 91, 100, 102, 109, 111, 118, 120, 137, 139, 148, 150, 157, 159, 166, 168 & 169-172  
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:  
**See Supplemental Box**
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 Supplemental Box for Details**

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 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.:  
**1-6 & 173**

**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.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | International application No.<br><b>PCT/US2022/041755</b> |
| <b>Supplemental Box</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                           |
| <p><b>Continuation of Box II</b><br/> Claims 52, 55, 64, 67, 78, 80, 89, 91, 100, 102, 109, 111, 118, 120, 137, 139, 148, 150, 157, 159, 166, 168 &amp; 169-172 do not comply with Rule 6.2(a) because they rely on references to the description and/or drawings.</p> <p><b>Continuation of: Box III</b><br/> This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invention 1 is defined by claims 1-6, 173 (in full). The feature of a method of disrupting a B2M locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a B2M locus (SEQ IDS Nos: 6305-6386, 6387-6468) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 2 is defined by claims 7-12, 103-111, 151-159, 174 (in full). The feature of a method of disrupting a TRAC locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a TRAC locus (SEQ IDS Nos: 5473, 5475, 6387-6548, 6804-6805, 7231-7256, 7269-7284, 11145, 11153, 11514-11517, 11714-11715) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 3 is defined by claims 13-18, 175 (in full). The feature of a method of disrupting a HPRT locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a HPRT locus (SEQ IDS Nos: 6616-6682) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 4 is defined by claims 19-24, 176 (in full). The feature of a method of disrupting a TRBC1/2 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a TRBC1/2 locus (SEQ IDS Nos: 6722-6760, 6782-6802) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 5 is defined by claims 25-29, 121-128, 177 (in full). The feature of a method of disrupting a HAO1 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a HAO1 locus (SEQ IDS Nos: 11773-11793, 11802-11820) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 6 is defined by claims 30-36, 68-69 (in full). The feature of an RNA-guided endonuclease comprising a RuvCIII domain (SEQ ID Nos: 421-431, 914, 1512, 1756, 2242, 2244, 11711-11713, 11716), and a method of disrupting an unspecified RNA locus in a cell using said endonuclease, is specific to this group of claims. Invention 6 can also be separated into a number of sub-inventions 6A-6H based on the Cas MG family- <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 6a- MG3- SEQ ID Nos: 421-431, 2242, 2244;</li> <li>○ 6b- MG14-241- SEQ ID No: 914;</li> <li>○ 6c- MG21- SEQ ID No: 1512;</li> <li>○ 6d- MG23- SEQ ID No: 1756;</li> <li>○ 6e- MG71- SEQ ID No: 11711;</li> <li>○ 6f- MG73- SEQ ID No: 11712;</li> <li>○ 6g- MG89- SEQ ID No: 11713;</li> <li>○ 6h- MG99- SEQ ID No: 11716.</li> </ul> </li> <li>• Invention 7 is defined by claims 37-44 (in full). The feature of a method of disrupting an unspecified locus with any RNA guided endonuclease and a guide RNA of unspecified sequence, in a PBMC, HSC or iPSC, is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 8 is defined by claims 45-55, 178 (in full). The feature of a method of disrupting a CD2 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a CD2 locus (SEQ IDS Nos: 6811-6894), is specific to this group of claims.</li> </ul> |                                                           |
| Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                           |

10

20

30

40

50

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | International application No.<br><b>PCT/US2022/041755</b> |
| <b>Supplemental Box</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                           |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Invention 9 is defined by claims 56-67, 179 (in full). The feature of a method of disrupting a CD5 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a CD5 locus (SEQ IDS Nos: 5499, 6895-7022), is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 10 is defined by claims 70-80, 180 (in full). The feature of disrupting a FAS locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a FAS locus (SEQ ID Nos: 7023-7090) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 11 is defined by claims 81-91, 181 (in full). The feature of disrupting a PD-1 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a PD-1 locus (SEQ ID Nos: 7091-7166) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 12 is defined by claims 92-102, 182 (in full). The feature of disrupting an hRosa26 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a hRosa26 locus (SEQ ID Nos: 7167-7230) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 13 is defined by claims 112-120, 160-168, 183 (in full). The feature of a method of disrupting an AAVS1 locus using a class 2 type II Cas/RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting an AAVS1 locus (SEQ ID Nos: 5475, 7257-7268, 11508-11513, 11715, 11717) is specific to this group of claims.</li> <li>• Invention 14 is defined by claims 129-150, 184 (in full). The feature of a method of disrupting a GPR146 locus using an RNA-guided endonuclease, and guide RNAs targeting a GPR146 locus (SEQ ID Nos: 11374-11507) is specific to this group of claims.</li> </ul> <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a class 2 type II CRISPR system*. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in D1:</p> <p>D1: JINEK, M. et al. "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." Science, 2012, 337(6096):816-821, DOI: 10.1126/science.122582 (cited in the application at p.79 par 490 as disclosing Class 2 type II CRISPR/Cas9 system).</p> <p>*although some claims are not limited to a class 2 type II CRISPR system and include any RNA-guided endonuclease (see eg claim 1 or claim 37).</p> <p>Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.</p> |                                                           |
| Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                           |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/US2022/041755             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
| US 2019/0062735 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 28 February 2019 | US 2019062735 A1              | 28 Feb 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2017226172 A1              | 27 Sep 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2017226172 A2              | 04 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3016331 A1                 | 08 Sep 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 109312340 A                | 05 Feb 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3423580 A1                 | 09 Jan 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 261163 A                   | 31 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 261163 B                   | 01 Oct 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 291971 A                   | 01 Jun 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2019507599 A               | 22 Mar 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20180118204 A              | 30 Oct 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 102438360 B1               | 31 Aug 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20220124278 A              | 13 Sep 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | MX 2018010484 A               | 10 Jan 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 11201807538P A             | 27 Sep 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2017152015 A1              | 08 Sep 2017      |
| US 2020/0332273 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 22 October 2020  | US 2020332273 A1              | 22 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10982200 B2                | 20 Apr 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2020223370 A1              | 07 Oct 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3130135 A1                 | 20 Aug 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113728098 A                | 30 Nov 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3924482 A1                 | 22 Dec 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | GB 2594339 A                  | 27 Oct 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2022520428 A               | 30 Mar 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20210139254 A              | 22 Nov 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020332274 A1              | 22 Oct 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 10913941 B2                | 09 Feb 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022033791 A1              | 03 Feb 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022220460 A1              | 14 Jul 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2020168291 A1              | 20 Aug 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2021226363 A1              | 11 Nov 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2020/168300 A1             | 20 August 2020   |
| AU 2020221409 A1                                                                                                                                                                                                                                                      | 02 Sep 2021      |                               |                  |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.                                                                                                                                             |                  |                               |                  |
| Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                                                                                                                                                            |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No.                                                                                             |                  |                  |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/US2022/041755                                                                                                         |                  |                  |             |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s                                                                                                    |                  |                  |             |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number                                                                                                        | Publication Date |                  |             |
| US 2019/0264232 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 29 August 2019   | CA 3128888 A1                                                                                                             | 20 Aug 2020      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CL 2021002147 A1                                                                                                          | 22 Apr 2022      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 113518821 A                                                                                                            | 19 Oct 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EA 202192265 A1                                                                                                           | 19 Nov 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3924467 A1                                                                                                             | 22 Dec 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 285543 A                                                                                                               | 30 Sep 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2022520402 A                                                                                                           | 30 Mar 2022      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20210129105 A                                                                                                          | 27 Oct 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | PE 20211959 A1                                                                                                            | 30 Sep 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 11202108644U A                                                                                                         | 29 Sep 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022143084 A1                                                                                                          | 12 May 2022      |                  |             |
| US 2019/0264232 A1                                                                                                                                                                                                                                                    | 29 August 2019   | US 2019264232 A1                                                                                                          | 29 Aug 2019      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3091267 A1                                                                                                             | 29 Aug 2019      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 112020554 A                                                                                                            | 01 Dec 2020      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3755792 A1                                                                                                             | 30 Dec 2020      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20200124702 A                                                                                                          | 03 Nov 2020      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022010293 A1                                                                                                          | 13 Jan 2022      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2019165168 A1                                                                                                          | 29 Aug 2019      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2018/064594 A2                                                                                                         | 05 April 2018    | WO 2018064594 A2 | 05 Apr 2018 |
| AU 2017336094 A1                                                                                                                                                                                                                                                      | 18 Apr 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| CA 3036713 A1                                                                                                                                                                                                                                                         | 05 Apr 2018      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| CN 109804064 A                                                                                                                                                                                                                                                        | 24 May 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| EP 3519562 A2                                                                                                                                                                                                                                                         | 07 Aug 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| JP 2019532640 A                                                                                                                                                                                                                                                       | 14 Nov 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| KR 20190049887 A                                                                                                                                                                                                                                                      | 09 May 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| US 2019233797 A1                                                                                                                                                                                                                                                      | 01 Aug 2019      |                                                                                                                           |                  |                  |             |
| WO 2020/084580 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 30 April 2020    |                                                                                                                           |                  | WO 2020084580 A1 | 30 Apr 2020 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                                                                                                                           |                  | AR 116804 A1     | 16 Jun 2021 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  |                                                                                                                           |                  | AU 2019365590 A1 | 22 Apr 2021 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 3116512 A1                                                                                                             | 30 Apr 2020      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CL 2021001034 A1                                                                                                          | 19 Nov 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 112969472 A                                                                                                            | 15 Jun 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CO 2021005289 A2                                                                                                          | 10 May 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CR 20210196 A                                                                                                             | 27 Jul 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EA 202191096 A1                                                                                                           | 10 Aug 2021      |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. |                  |                  |             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                |                  |                  |             |

10

20

30

40

50

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT                                                                                                                                                                                                                                           |                  | International application No. |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members                                                                                                                                                                                                                                  |                  | PCT/US2022/041755             |                  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |                  |                               |                  |
| Patent Document/s Cited in Search Report                                                                                                                                                                                                                              |                  | Patent Family Member/s        |                  |
| Publication Number                                                                                                                                                                                                                                                    | Publication Date | Publication Number            | Publication Date |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EC SP21028556 A               | 31 May 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3870289 A1                 | 01 Sep 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | IL 282447 A                   | 30 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2022505658 A               | 14 Jan 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20210069075 A              | 10 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | PE 20211114 A1                | 22 Jun 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | PH 12021550761 A1             | 13 Dec 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | SG 11202102615R A             | 28 May 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | TW 202030324 A                | 16 Aug 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2020131474 A1              | 30 Apr 2020      |
| EP 3699268 A1                                                                                                                                                                                                                                                         | 26 August 2020   | UY 38427 A                    | 29 May 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3699268 A1                 | 26 Aug 2020      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 107723275 A                | 23 Feb 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 107723275 B                | 04 Sep 2020      |
| WO 2016/160721 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 06 October 2016  | WO 2019076149 A1              | 25 Apr 2019      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | WO 2016160721 A1              | 06 Oct 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2016243583 A1              | 16 Nov 2017      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2016243583 B2              | 10 Mar 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | AU 2022203963 A1              | 23 Jun 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | BR 112017020750 A2            | 26 Jun 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CA 2984237 A1                 | 06 Oct 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | CN 107847524 A                | 27 Mar 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | EP 3273976 A1                 | 31 Jan 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | HK 1250481 A1                 | 21 Dec 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2018510657 A               | 19 Apr 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | JP 2021137036 A               | 16 Sep 2021      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | KR 20180020125 A              | 27 Feb 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | MX 2017012407 A               | 07 Mar 2018      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2016348073 A1              | 01 Dec 2016      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022162554 A1              | 26 May 2022      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                       |                  | US 2022162555 A1              | 26 May 2022      |
| WO 2022/159758 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 28 July 2022     | WO 2022159758 A1              | 28 Jul 2022      |
| WO 2022/132765 A1                                                                                                                                                                                                                                                     | 23 June 2022     | WO 2022132765 A1              | 23 Jun 2022      |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.<br>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                               |                  |                               |                  |

10

20

30

40

50

|                                                                                                                                                                                                                                                                       |  |                                                                                    |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b><br>Information on patent family members                                                                                                                                                                                            |  | International application No.<br><b>PCT/US2022/041755</b>                          |  |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. |  |                                                                                    |  |
| <b>Patent Document/s Cited in Search Report</b><br><b>Publication Number</b> <b>Publication Date</b>                                                                                                                                                                  |  | <b>Patent Family Member/s</b><br><b>Publication Number</b> <b>Publication Date</b> |  |
| <b>End of Annex</b>                                                                                                                                                                                                                                                   |  |                                                                                    |  |
| Empty table body for the annex                                                                                                                                                                                                                                        |  |                                                                                    |  |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.<br>Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)                                                                                               |  |                                                                                    |  |

## フロントページの続き

(32)優先日 令和3年10月6日(2021.10.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/282,909

(32)優先日 令和3年11月24日(2021.11.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/316,895

(32)優先日 令和4年3月4日(2022.3.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/319,681

(32)優先日 令和4年3月14日(2022.3.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/322,944

(32)優先日 令和4年3月23日(2022.3.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/369,858

(32)優先日 令和4年7月29日(2022.7.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PYTHON

2. TRITON

(72)発明者 カンター，ローズ

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 デヴォート，オードラ

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 バターフィールド，クリスティーナ

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 アレクサンダー，リサ

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 ゴルツマン，ダニエラ エス．エー．

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 リュー，ジェイソン

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

(72)発明者 ラモット，レベッカ

アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5

- 
- (72)発明者 エスピノサ, ディエゴ  
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 ストーリー, メーガン  
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5
- (72)発明者 コスト, グレッグ  
アメリカ合衆国 9 4 6 0 8 カリフォルニア州 エメリービル パーク・アベニュー 1 5 4 5