(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-512758
(P2023-512758A)
(43)公表日　令和5年3月29日(2023.3.29)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/113(2010.01)*	C12N	15/113	ZZNA	4C076
C12N	*15/09 (2006.01)*	C12N	15/09	110	4C084
A61K	*31/7105(2006.01)*	A61K	31/7105		4C086
A61P	*7/10 (2006.01)*	A61P	7/10		
A61K	*48/00 (2006.01)*	A61K	48/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全204頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-547680(P2022-547680)
(86)(22)出願日　令和3年2月5日(2021.2.5)
(85)翻訳文提出日　令和4年9月14日(2022.9.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/016730
(87)国際公開番号　WO2021/158858
(87)国際公開日　令和3年8月12日(2021.8.12)
(31)優先権主張番号　62/971,906
(32)優先日　令和2年2月7日(2020.2.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/981,965
(32)優先日　令和2年2月26日(2020.2.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/019,076
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　カリクレイン（ＫＬＫＢ１）遺伝子編集のための組成物および方法

(57)【要約】
ＫＬＫＢ１遺伝子内で編集するための、例えば、二本鎖切断を導入するための組成物および方法が提供される。遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を有する対象を治療するための組成物および方法が提供される。
【選択図】図１０

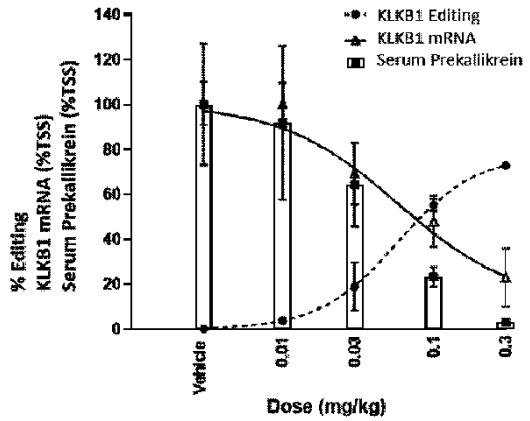


Fig. 10

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ガイドＲＮＡであって、
ａ．配列番号１５、８、および４１から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一を含むガイド配列、
ｂ．配列番号１５、８、および４１から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチドを含むガイド配列、または
ｃ．配列番号１５、８、および４１から選択されるガイド配列を含む、
前記ガイドＲＮＡ。
【請求項２】
配列番号２０２のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項３】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号１７０、１７１、１７２、および１７３から選択されるヌクレオチド配列をさらに含み、前記配列番号１７０、１７１、１７２、または１７３の配列が、前記ガイド配列の３’である、請求項１に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項４】
前記ガイドＲＮＡが、３’テールをさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項５】
前記ガイドＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項６】
前記修飾が、５’末端修飾を含む、請求項５に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項７】
前記修飾が、３’末端修飾を含む、請求項５または６に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項８】
前記ガイドＲＮＡが、ヘアピン領域における修飾を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項９】
前記修飾が、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１０】
前記修飾が、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１１】
前記修飾が、２’－フルオル（ｆｌｕｏｒ）（２’Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１２】
配列番号１７１のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１または３～１１のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１３】
配列番号４０５のヌクレオチド配列のパターンに従って修飾された、請求項１２に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１４】
配列番号１７３のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項１または３～１１のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１５】
配列番号２４８～２５５または４５０のパターンに従って修飾された、請求項１４に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１６】

前記ガイド配列が、配列番号１５である、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１７】
前記ガイド配列が、配列番号８である、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１８】
前記ガイド配列が、配列番号４１である、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項１９】
前記ガイドＲＮＡが、配列番号３００のパターンに従って修飾され、Ｎが、まとめて、請求項１に記載のガイド配列である、請求項１または４～１１のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項２０】
配列番号３００中の各Ｎが、任意の天然または非天然ヌクレオチドである、請求項１６に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項２１】
前記ガイド配列が、配列番号１５であり、前記ガイドＲＮＡが、ｍＧ＊ｍＧ＊ｍＡ＊ＵＵＧＣＧＵＡＵＧＧＧＡＣＡＣＡＡＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、請求項１９に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項２２】
前記ガイド配列が、配列番号８であり、前記ガイドＲＮＡが、ｍＵ＊ｍＡ＊ｍＣ＊ＣＣＧＧＧＡＧＵＵＧＡＣＵＵＵＧＧＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、請求項１９に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項２３】
前記ガイド配列が、配列番号４１であり、前記ガイドＲＮＡが、ｍＵ＊ｍＡ＊ｍＵ＊ＵＡＵＣＡＡＡＵＣＡＣＡＵＵＡＣＣＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、請求項１９に記載のガイドＲＮＡ。
【請求項２４】
請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡを含む、組成物。
【請求項２５】
ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸をさらに含む、請求項２４に記載の組成物。
【請求項２６】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む、請求項２５に記

載の組成物。
【請求項２７】
前記ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、請求項２５または２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記Ｃａｓ９が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ Ｃａｓ９である、請求項２７に記載の組成物。
【請求項２９】
前記ＯＲＦが、修飾ＯＲＦである、請求項２６～２８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３０】
薬学的賦形剤をさらに含む、請求項２４～２９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３１】
前記ガイドＲＮＡが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、請求項２４～３０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３２】
前記ＬＮＰが、陽イオン性脂質を含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記陽イオン性脂質が、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエートであり、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも呼ばれる、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
前記ＬＮＰが、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも呼ばれる）と、ＤＳＰＣと、コレステロールと、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧと、を含む、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３５】
請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡまたは請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を含む、薬学的組成物。
【請求項３６】
細胞内のＫＬＫＢ１遺伝子内の二本鎖切断もしくは一本鎖切断を誘導するか、または細胞内のＫＬＫＢ１の発現を低下させるための、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を含む薬学的組成物、またはその使用。
【請求項３７】
細胞または対象において前記ＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させるための、請求項３６に記載の薬学的組成物、またはその使用。
【請求項３８】
遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を有する対象を治療するための、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を含む薬学的組成物、またはその使用。
【請求項３９】
ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させることを含む、請求項３８に記載の薬学的組成物、またはその使用。
【請求項４０】
ＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、

気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防するための、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を含む薬学的組成物、またはその使用。
【請求項４１】
対象において、総血漿カリクレイン活性を低下させるか、またはプレカリクレインおよび／もしくはカリクレインレベルを低下させるための、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を含む薬学的組成物、またはその使用。
【請求項４２】
前記総血漿カリクレイン活性が、６０％より大きく低下する、請求項４１に記載の薬学的組成物、またはその使用。
【請求項４３】
方法、または細胞内のＫＬＫＢ１遺伝子内の二本鎖切断もしくは一本鎖切断を誘導する、または細胞内のＫＬＫＢ１の発現を低下することであって、細胞を、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物と接触させることを含む、方法。
【請求項４４】
前記細胞が、対象内のものである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を有する対象を治療する方法であって、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡまたは請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、それによって前記対象を治療する、前記方法。
【請求項４６】
前記対象を治療することが、ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させることを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
ＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防する方法であって、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を前記対象に投与することを含み、それによって、前記対象においてＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防する、前記方法。
【請求項４８】
対象における総血漿カリクレイン活性を低下させる方法であって、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡまたは請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、それによって対象における総血漿カリクレイン活性を低下させる、前記方法。
【請求項４９】
前記総血漿カリクレイン活性が、前記対象において６０％より大きく低下する、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
請求項４３～４９のいずれか一項に記載の方法を実施するための医薬の調製における、請求項１～２３のいずれか一項に記載のガイドＲＮＡ、または請求項２４～３４のいずれか一項に記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２０年２月７日に出願された米国仮特許出願第６２／９７１，９０６号、２０２０年２月２６日に出願された米国仮特許出願第６２／９８１，９６５号、および２０２０年５月１日に出願された米国仮特許出願第６３／０１９，０７６号に対する優先

権を主張し、これらの各々の内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含有し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。２０２１年２月４日に作成された上記のＡＳＣＩＩコピーの名称は、０１１５５－００３１－００ＰＣＴ＿ＳＴ２５．ｔｘｔであり、サイズは１８４，５８４バイトである。

【背景技術】

【０００３】

遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）は、５０，０００人に１人が罹患し、年間１５，０００～３０，０００人の救急外来受診の一因となっている。ＨＡＥは、重度の腫脹（血管浮腫）の再発事象を特徴とする、稀な常染色体優性の遺伝性血管障害である。腫脹を発症する身体の最も一般的な領域は、四肢、顔、ＧＩ管、および気道である。軽微な外傷またはストレスが、発作を引き起こす場合があるが、腫脹は、既知のトリガーなしに起こることが多い。腸管が関与する事象は、重度の腹痛、吐き気、および嘔吐を引き起こす。気道の腫脹は、呼吸を制限し、生命を脅かす気道の閉塞または窒息を引き起こす場合がある。ＨＡＥの症状は、典型的には、小児期に始まり、思春期の間に悪化する。平均して、治療を受けていない個人は、１～２週ごとに発作を起こし、ほとんどの事象は、約３～４日間続く。Ｉ型、ＩＩ型およびＩＩＩ型と呼ばれる３種類の遺伝性血管浮腫が存在し、異なる型は、同様の徴候および症状を有する。

【０００４】

遺伝性血管浮腫は、血液中の過剰なブラジキニンに起因し、血管透過性および腫脹の事象を促進する。ほとんどのＨＡＥ患者は、Ｃ１阻害剤（Ｃ１エステラーゼ阻害剤またはＣ１－ＩＮＨとも呼ばれる）タンパク質欠損症を有する。Ｃ１－ＩＮＨが存在しない場合、ブラジキニンレベルが上昇し、血管漏出を開始し、腫脹発作を引き起こす可能性がある。その産生は、Ｃ１－ＩＮＨによって内因的に阻害されるカリクレイン－キニン（接触）経路を介して制御される。ブラジキニンペプチドは、高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）が、タンパク質プレカリクレインの活性化形態である血漿カリクレイン（ｐＫａｌ）によって切断されると、形成される。プレカリクレインは、ＫＬＫＢ１によってコードされ、ＫＬＫＢ１タンパク質とも呼ばれる。ＫＬＫＢ１タンパク質は、肝臓で産生され、第ＸＩＩａ因子によって活性化され得る血漿中に分泌される。ＫＬＫＢ１が活性化されると、ｐＫａｌは、ブラジキニンレベルを増加させることができる。血液中の過剰なブラジキニンは、血管の壁を通って体組織に流体漏出を引き起こす。体組織内の液体が過剰に蓄積されると、ＨＡＥ患者にみられる腫脹の事象を引き起こす。

【０００５】

Ｃ１エステラーゼ阻害剤（Ｂｅｒｉｎｅｒｔ（登録商標）、Ｃｉｎｒｙｚｅ（登録商標））、組換えＣ１－ＩＮＨ補充療法（ｒｈＣ１ＩＮＨ、コネスタットアルファ（Ｒｈｕｃｉｎ（登録商標）、Ｒｕｃｏｎｅｓｔ（登録商標））、およびブラジキニン受容体アンタゴニスト（Ｉｃａｔｉｂａｎｔ、Ｆｉｒａｚｙｒ（登録商標））を含む、カリクレイン－キニン経路を標的とするいくつかの薬物が開発されてきた。カリクレインまたはプレカリクレイン（ＫＬＫＢ１）阻害剤を使用するアプローチも開発されてきた（エカランチド、Ｋａｌｂｉｔｏｒ（登録商標）、ラナデルマブ、Ｔａｋｈｚｙｒｏ（商標））。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、ＫＬＫＢ１遺伝子をノックアウトするためにＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用し、それによってプレカリクレイン（ＫＬＫＢ１）の産生を低下させ、カリクレインを低下させ、ＨＡＥを有する対象におけるブラジキニン産生を低下させる組成物および方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００７】
したがって、以下の実施形態が提供される。いくつかの実施形態では、本発明は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系等のＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともにガイドＲＮＡを用い、ＫＬＫＢ１遺伝子の発現を実質的に低下させるか、またはノックアウトし、それによって、ブラジキニンの産生を実質的に低下させるか、またはなくす組成物および方法を提供する。ＫＬＫＢ１遺伝子の改変によってブラジキニンの産生を実質的に低下させるか、またはなくすことは、長期的または永続的な治療となり得る。
【０００８】
以下の実施形態が本明細書で提供される。
【０００９】
実施形態Ａ１は、ガイドＲＮＡであって、
ａ．配列番号１５、８、および４１から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、または８５％同一を含むガイド配列、
ｂ．配列番号１５、８、および４１から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドを含むガイド配列、または
ｃ．配列番号１５、８、および４１から選択されるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡである。
【００１０】
実施形態Ａ２は、配列番号２０２のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態Ａ１のガイドＲＮＡである。
【００１１】
実施形態Ａ３は、ガイドＲＮＡが、配列番号１７０、１７１、１７２、および１７３から選択されるヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号１７０、１７１、１７２、または１７３の配列が、ガイド配列の３’である、実施形態Ａ１のガイドＲＮＡである。
【００１２】
実施形態Ａ４は、ガイドＲＮＡが、３’テールをさらに含む、実施形態Ａ１～Ａ３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００１３】
実施形態Ａ５は、ガイドＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、実施形態Ａ１～Ａ４のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００１４】
実施形態Ａ６は、修飾が、５’末端修飾を含む、実施形態Ａ５のガイドＲＮＡである。
【００１５】
実施形態Ａ７は、修飾が、３’末端修飾を含む、実施形態Ａ５またはＡ６のガイドＲＮＡである。
【００１６】
実施形態Ａ８は、ガイドＲＮＡが、ヘアピン領域における修飾を含む、実施形態Ａ１～Ａ７のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００１７】
実施形態Ａ９は、修飾が、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む、実施形態Ａ１～Ａ８のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００１８】
実施形態Ａ１０は、修飾が、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、実施形態Ａ１～Ａ９のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００１９】
実施形態Ａ１１は、修飾が、２’－フルオル（ｆｌｕｏｒ）（２’Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む、実施形態Ａ１～Ａ１０のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２０】
実施形態Ａ１２は、配列番号１７１のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態Ａ１またはＡ３～Ａ１１のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。

【００２１】
実施形態Ａ１３は、配列番号４０５のヌクレオチド配列のパターンに従って修飾された、実施形態Ａ１２のガイドＲＮＡである。
【００２２】
実施形態Ａ１４は、配列番号１７３のヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態Ａ１またはＡ３～Ａ１１のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２３】
実施形態Ａ１５は、配列番号２４８～２５５または４５０のパターンに従って修飾された、実施形態Ａ１４のガイドＲＮＡである。
【００２４】
実施形態Ａ１６は、ガイド配列が、配列番号１５である、実施形態Ａ１２～Ａ１５のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２５】
実施形態Ａ１７は、ガイド配列が、配列番号８である、実施形態Ａ１２～Ａ１５のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２６】
実施形態Ａ１８は、ガイド配列が、配列番号４１である、実施形態Ａ１２～Ａ１５のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２７】
実施形態Ａ１９は、ガイドＲＮＡが、配列番号３００のパターンに従って修飾され、Ｎが、まとめて、実施形態Ａ１のガイド配列である、実施形態Ａ１またはＡ４～Ａ１１のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡである。
【００２８】
実施形態Ａ２０は、配列番号３００中の各Ｎが、任意の天然または非天然ヌクレオチドである、実施形態Ａ１６のガイドＲＮＡである。
【００２９】
実施形態Ａ２１は、ガイド配列が、配列番号１５であり、ガイドＲＮＡが、ｍＧ＊ｍＧ＊ｍＡ＊ＵＵＧＣＧＵＡＵＧＧＧＡＣＡＣＡＡＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、実施形態Ａ１９のガイドＲＮＡである。
【００３０】
実施形態Ａ２２は、ガイド配列が、配列番号８であり、ガイドＲＮＡが、ｍＵ＊ｍＡ＊ｍＣ＊ＣＣＧＧＧＡＧＵＵＧＡＣＵＵＵＧＧＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、実施形態Ａ１９のガイドＲＮＡである。
【００３１】
実施形態Ａ２３は、ガイド配列が、配列番号４１であり、ガイドＲＮＡが、ｍＵ＊ｍＡ＊ｍＵ＊ＵＡＵＣＡＡＡＵＣＡＣＡＵＵＡＣＣＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵに従って修飾され、「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」または「ｍＧ」が、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを

示し、＊が、ホスホロチオエート結合を示し、Ｎが、天然ヌクレオチドである、実施形態Ａ１９のガイドＲＮＡである。

【００３２】

実施形態Ａ２４は、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡを含む、組成物である。

【００３３】

実施形態Ａ２５は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸をさらに含む、実施形態Ａ２４の組成物である。

【００３４】

実施形態Ａ２６は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む、実施形態Ａ２５の組成物である。

【００３５】

実施形態Ａ２７は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、実施形態Ａ２５またはＡ２６の組成物である。

【００３６】

実施形態Ａ２８は、Ｃａｓ９が、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９である、実施形態Ａ２７の組成物である。

【００３７】

実施形態Ａ２９は、ＯＲＦが、修飾ＯＲＦである、実施形態Ａ２６～Ａ２８のうちのいずれか１つの組成物である。

【００３８】

実施形態Ａ３０は、薬学的賦形剤をさらに含む、実施形態Ａ２４～Ａ２９のうちのいずれか１つの組成物である。

【００３９】

実施形態Ａ３１は、ガイドＲＮＡが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、実施形態Ａ２４～Ａ３０のうちのいずれか１つの組成物である。

【００４０】

実施形態Ａ３２は、ＬＮＰが、陽イオン性脂質を含む、実施形態Ａ３１の組成物である。

【００４１】

実施形態Ａ３３は、陽イオン性脂質が、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエートであり、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも呼ばれる、実施形態Ａ３２の組成物である。

【００４２】

実施形態Ａ３４は、ＬＮＰが、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート（３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも呼ばれる）と、ＤＳＰＣと、コレステロールと、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧと、を含む、実施形態Ａ３１～Ａ３３のうちのいずれか１つの組成物である。

【００４３】

実施形態Ａ３５は、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を含む、薬学的組成物である。

【００４４】

実施形態Ａ３６は、細胞内のＫＬＫＢ１遺伝子内の二本鎖切断もしくは一本鎖切断を誘

導するか、または細胞内のＫＬＫＢ１の発現を低下させるための、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を含む薬学的組成物、またはその使用である。

【００４５】

実施形態Ａ３７は、細胞または対象においてＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させるための、実施形態Ａ３６の薬学的組成物、またはその使用である。

【００４６】

実施形態Ａ３８は、遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を有する対象を治療するための、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を含む薬学的組成物、またはその使用である。

【００４７】

実施形態Ａ３９は、ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させることを含む、実施形態Ａ３８の薬学的組成物、またはその使用である。

【００４８】

実施形態Ａ４０は、ＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防するための、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を含む薬学的組成物、またはその使用である。

【００４９】

実施形態Ａ４１は、対象における総血漿カリクレイン活性を低下させるか、またはプレカリクレインおよび／もしくはカリクレインレベルを低下させるための、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を含む薬学的組成物、またはその使用である。

【００５０】

実施形態Ａ４２は、総血漿カリクレイン活性が、６０％より大きく低下する、実施形態Ａ４１の薬学的組成物、またはその使用である。

【００５１】

実施形態Ａ４３は、方法、または細胞内のＫＬＫＢ１遺伝子内の二本鎖切断または一本鎖切断を誘導する、または細胞内のＫＬＫＢ１の発現を低下することであって、細胞を、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物と接触させることを含む、方法である。

【００５２】

実施形態Ａ４４は、細胞が、対象内のものである、実施形態Ａ４３の方法である。

【００５３】

実施形態Ａ４５は、遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を有する対象を治療する方法であって、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～３４のうちのいずれか１つの組成物を投与することを含み、それによって対象を治療する、方法である。

【００５４】

実施形態Ａ４６は、対象を治療することが、ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させることを含む、実施形態Ａ４５の方法である。

【００５５】

実施形態Ａ４７は、ＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防する方法であって、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を対象に投与することを含み、それによって、対象においてＨＡＥに関連する血管浮腫、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防する、方法である。

【００５６】

実施形態Ａ４８は、対象における総血漿カリクレイン活性を低下させる方法であって、

実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡまたは実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物を投与することを含み、それによって対象における総血漿カリクレイン活性を低下させる、方法である。

【００５７】

実施形態Ａ４９は、総血漿カリクレイン活性が、対象において６０％より大きく低下する、実施形態Ａ４８の方法である。

【００５８】

実施形態Ａ５０は、実施形態Ａ４３～Ａ４９のうちのいずれか１つの方法を実施するための医薬の調製における、実施形態Ａ１～Ａ２３のうちのいずれか１つのガイドＲＮＡ、または実施形態Ａ２４～Ａ３４のうちのいずれか１つの組成物の使用である。

【００５９】

追加の実施形態が、本明細書で提供される。

【００６０】

実施形態１は、ＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）または一本鎖切断（ＳＳＢ）を誘導する方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

ａ．ガイドＲＮＡであって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または

ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または

ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、

ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含む、方法である。

【００６１】

実施形態２は、ＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させる方法であって、組成物を細胞に送達することを含み、組成物が、

ａ．ガイドＲＮＡであって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または

ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または

ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含む、方法である。

【００６２】

実施形態３は、遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を治療または予防する方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによってＨＡＥを治療または予防する、方法である。

【００６３】

実施形態４は、ＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫、またはＨＡＥに関連する血管浮腫を治療または予防する方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによってＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫、またはＨＡＥに関連する血管浮腫を治療または予防する、方法である。

【００６４】

実施形態５は、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮

腫閉塞、または窒息のうちのいずれか１つを治療または予防する方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、

ａ．ガイドＲＮＡであって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または

ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または

ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、

ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによってブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息のうちのいずれか１つを治療または予防する、方法である。

【００６５】

実施形態６は、ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させる方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、

ａ．ガイドＲＮＡであって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または

ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または

ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、

ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによってＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させる、方法である。

【００６６】

実施形態７は、対象において血管浮腫発作の頻度および／もしくは重症度を低下させるか、または血管浮腫発作の寛解を達成するための方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、

ａ．ガイドＲＮＡであって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、

もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによって対象において血管浮腫発作の頻度および／もしくは重症度を低下させるか、または血管浮腫発作の寛解を達成する、方法である。

【００６７】

実施形態８は、総血漿カリクレイン活性を低下させる方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによって対象において血管浮腫発作の寛解を達成し、総血漿カリクレイン活性を低下させる、方法である。

【００６８】

実施形態９は、プレカリクレインをその活性形態であるｐＫａｌに変換するための活性化ステップをさらに含む、実施形態８の方法である。

【００６９】

実施形態１０は、総血漿カリクレイン活性が、６０％より大きく低下し、８５％より大きく低下し、または６０～８０％より大きく低下する、実施形態８の方法である。

【００７０】

実施形態１１は、総血漿カリクレインレベルを低下させる方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、

もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによって総血漿カリクレインレベル、方法である。

【００７１】

実施形態１２は、プレカリクレインおよび／もしくはカリクレインレベルを低下させる方法であって、組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、組成物が、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸、を含み、それによってプレカリクレインおよび／もしくはカリクレインを低下させる、方法である。

【００７２】

実施形態１３は、編集率において用量依存的な増加が存在する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。

【００７３】

実施形態１４は、総血漿カリクレインレベルにおいて用量依存的な低下が存在する、実施形態１３の方法である。

【００７４】

実施形態１５は、血漿カリクレイン活性において用量依存的な低下が存在する、実施形態１３または１４の方法である。

【００７５】

実施形態１６は、効果が、投与後少なくとも１ヶ月、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年、１０年、またはさらに長く持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。

【００７６】
実施形態１７は、効果が、少なくとも６ヶ月持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００７７】
実施形態１８は、効果が、少なくとも１年持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００７８】
実施形態１９は、ＨＡＥ発作の頻度を低下させる、実施形態６の方法である。
【００７９】
実施形態２０は、頻度を、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも６０～８０％、または少なくとも４０～９０％低下させる、実施形態１９の方法である。
【００８０】
実施形態２１は、頻度を、少なくとも６０～８０％低下させる、実施形態２０の方法である。
【００８１】
実施形態２２は、頻度を、少なくとも４０～９０％低下させる、実施形態２０の方法である。
【００８２】
実施形態２３は、効果が、投与後少なくとも１ヶ月、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年、１０年、またはさらに長く持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８３】
実施形態２４は、効果が、投与後少なくとも６ヶ月持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８４】
実施形態２５は、効果が、投与後少なくとも１年持続する、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８５】
実施形態２６は、効果が、基底レベルと比較される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８６】
実施形態２７は、効果が、対象の基底レベルと比較される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８７】
実施形態２８は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸が投与される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法である。
【００８８】
実施形態２９は、組成物であって、
ａ．ガイドＲＮＡであって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌク

レオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイドＲＮＡ、および任意選択で、
ｂ．ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードする核酸を含む、組成物である。

【００８９】

実施形態３０は、短いシングルガイドＲＮＡ（短いｓｇＲＮＡ）を含む組成物であって、
ａ．ガイド配列であって、
ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または
ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または
ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または
ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイド配列と、
ｂ．ヘアピン領域を含むｓｇＲＮＡの保存部分であって、ヘアピン領域が、少なくとも５～１０個のヌクレオチドを欠失しており、任意選択で、短いｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾のうちの１つ以上を含む、保存部分と、を含む、組成物である。

【００９０】

実施形態３１。配列番号２０２の配列を含む、実施形態２９の組成物。

【００９１】

実施形態３２は、５’末端修飾を含む、実施形態２９または実施形態３０の組成物である。

【００９２】

実施形態３３は、短いｓｇＲＮＡが、３’末端修飾を含む、実施形態２９～３２のうちのいずれか１つの組成物である。

【００９３】

実施形態３４は、短いｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾を含む、実施形態２９～３３のうちのいずれか１つの組成物である。

【００９４】

実施形態３５は、短いｓｇＲＮＡが、３’テールをさらに含む、実施形態２９～３４のうちのいずれか１つの組成物である。

【００９５】

実施形態３６は、３’テールが、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のヌクレオチドを含む、実施形態３５の組成物である。

【００９６】

実施形態３７は、３’テールが、約１～２、１～３、１～４、１～５、１～７、１～１０、少なくとも１～２、少なくとも１～３、少なくとも１～４、少なくとも１～５、少なくとも１～７、または少なくとも１～１０個のヌクレオチドを含む、実施形態３５の組成

物である。
【００９７】
実施形態３８は、短いｓｇＲＮＡが、３’テールを含まない、実施形態２９～３７のうちのいずれか１つの組成物である。
【００９８】
実施形態３９は、ヘアピン領域内に修飾を含む、実施形態２９～３８のうちのいずれか１つの組成物である。
【００９９】
実施形態４０は、３’末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、を含む、実施形態２９～３９のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１００】
実施形態４１は、３’末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、５’末端修飾と、を含む、実施形態２９～４０のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１０１】
実施形態４２は、５’末端修飾と、ヘアピン領域内の修飾と、を含む、実施形態２９～４１のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１０２】
実施形態４３は、ヘアピン領域が、少なくとも５個の連続ヌクレオチドを欠失している、実施形態２９～４２のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１０３】
実施形態４４は、少なくとも５～１０個の欠失しているヌクレオチドが、
ａ．ヘアピン１内にある、
ｂ．ヘアピン１およびヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」内にある、
ｃ．ヘアピン１およびヘアピン１の直ぐ３’側の２個のヌクレオチド内にある、
ｄ．ヘアピン１の少なくとも一部を含む、
ｅ．ヘアピン２内にある、
ｆ．ヘアピン２の少なくとも一部を含む、
ｇ．ヘアピン１およびヘアピン２内にある、
ｈ．ヘアピン１の少なくとも一部を含み、ヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」を含む、
ｉ．ヘアピン２の少なくとも一部を含み、ヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」を含む、
ｊ．ヘアピン１の少なくとも一部を含み、ヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」を含み、ヘアピン２の少なくとも一部を含む、
ｋ．ヘアピン１もしくはヘアピン２内にあり、任意選択で、ヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」を含む、
ｌ．連続している、
ｍ．連続しており、ヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」を含む、
ｎ．連続しており、少なくともヘアピン１の一部およびヘアピン２の一部に及ぶ、
ｏ．連続しており、ヘアピン１の少なくとも一部およびヘアピン１とヘアピン２との間の「Ｎ」に及ぶ、
ｐ．連続しており、ヘアピン１の少なくとも一部およびヘアピン１の直ぐ３’側の２個のヌクレオチドに及ぶ、
ｑ．５～１０個のヌクレオチドからなる、
ｒ．６～１０個のヌクレオチドからなる、
ｓ．５～１０個の連続ヌクレオチドからなる、
ｔ．６～１０個の連続ヌクレオチドからなる、または
ｕ．配列番号４００のヌクレオチド５４～５８からなる、実施形態２９～４３のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１０４】

実施形態４５は、ネクサス領域を含むｓｇＲＮＡの保存部分を含み、ネクサス領域が、少なくとも１個のヌクレオチドを欠失している、実施形態２９～４４のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１０５】

実施形態４６は、ネクサス領域内で欠失しているヌクレオチドが、

ａ．ネクサス領域内の少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のヌクレオチド、

ｂ．ネクサス領域内の少なくともまたは正確に１～２個のヌクレオチド、１～３個のヌクレオチド、１～４個のヌクレオチド、１～５個のヌクレオチド、１～６個のヌクレオチド、１～１０個のヌクレオチド、または１～１５個のヌクレオチド、および

ｃ．ネクサス領域内の各ヌクレオチドのうちのいずれか１つ以上を含む、実施形態４５の組成物である。

【０１０６】

実施形態４７は、修飾シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を含む組成物であって、

ａ．ガイド配列であって、

ｉ．配列番号１～１４９から選択されるガイド配列、または

ｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｉｉｉ．配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列、または

ｉｖ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列、または

ｖｉ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または

ｖｉｉ．（ｖｉ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または

ｖｉｉｉ．（ｖｉ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含む、ガイド配列を含み、

さらに

ｂ．以下

１．１つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、

２．１つ以上の保存領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、

３．１つ以上のガイド領域ＹＡ部位および１つ以上の保存領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、

４．ｉ）２つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、

ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに

ｉｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、または

５．ｉ）１つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾であって、ガイド領域ＹＡ部位が、５’末端部の５’末端から８番目のヌクレオチド、またはその後にある、ＹＡ修飾、

ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに任意選択で、

ｉｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、または

６．ｉ）１つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾であって、ガイド領域ＹＡ部位が、ガイド領域の３’末端部のヌクレオチドの１３個のヌクレオチド内にある、Ｙ

Ａ修飾、
　　ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに
　　ｉｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、または
　７．ｉ）５’末端修飾および３’末端修飾、
　　ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに
　　ｉｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、または
　８．ｉ）ガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾であって、ガイド領域ＹＡ部位の修飾が、ガイド領域ＹＡ部位の５’に位置する少なくとも１個のヌクレオチドが含まない修飾を含む、ＹＡ修飾
　　ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに
　　ｉｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、または
　９．ｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに
　　ｉｉ）保存領域ＹＡ部位１および８におけるＹＡ修飾、または
　１０．ｉ）１つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾であって、ＹＡ部位が、５’末端部の８番目のヌクレオチド、またはその後にある、ＹＡ修飾、
　　ｉｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびに
　　ｉｉｉ）Ｈ１－１およびＨ２－１のうちの１つ以上における修飾、または
　１１．ｉ）保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ｉｉ）保存領域ＹＡ部位１、５、６、７、８、および９のうちの１つ以上におけるＹＡ修飾、ならびにｉｉｉ）Ｈ１－１およびＨ２－１のうちの１つ以上における修飾、または
　１２．ｉ）ＹＡ修飾等の、５’末端部から６番目のヌクレオチド、またはその後に位置する１つ以上のヌクレオチドにおける修飾、
　　ｉｉ）１つ以上のガイド配列ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、
　　ｉｉｉ）Ｂ３、Ｂ４、およびＢ５のうちの１つ以上における修飾であって、Ｂ６が、２’－ＯＭｅ修飾を含まないか、もしくは２’－ＯＭｅ以外の修飾を含む、修飾、
　　ｉｖ）ＬＳ１０における修飾であって、ＬＳ１０が、２’－フルオロ以外の修飾を含む、修飾、ならびに／または
　　ｖ）Ｎ２、Ｎ３、Ｎ４、Ｎ５、Ｎ６、Ｎ７、Ｎ１０、もしくはＮ１１における修飾、から選択される１つ以上の修飾を含み、
以下
　　ｉ．１つ以上のガイド領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、
　　ｉｉ．１つ以上の保存領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、
　　ｉｉｉ．１つ以上のガイド領域ＹＡ部位および１つ以上の保存領域ＹＡ部位におけるＹＡ修飾、
　　ｉｖ．５’末端部の５’末端からのヌクレオチド８～１１、１３、１４、１７、または１８のうちの少なくとも１つが、２’－フルオロ修飾を含まない、
　　ｖ．５’末端部の５’末端からのヌクレオチド６～１０のうちの少なくとも１つが、ホスホロチオエート連結を含まない、
　　ｖｉ．Ｂ２、Ｂ３、Ｂ４、もしくはＢ５のうちの少なくとも１つが、２’－ＯＭｅ修飾を含まない、
　　ｖｉｉ．ＬＳ１、ＬＳ８、もしくはＬＳ１０のうちの少なくとも１つが、２

’－ＯＭｅ修飾を含まない、
ｖｉｉｉ．Ｎ２、Ｎ３、Ｎ４、Ｎ５、Ｎ６、Ｎ７、Ｎ１０、Ｎ１１、Ｎ１６、もしくはＮ１７のうちの少なくとも１つが、２’－ＯＭｅ修飾を含まない、
ｉｘ．Ｈ１－１が、修飾を含む、
ｘ．Ｈ２－１が、修飾を含む、または
ｘｉ．Ｈ１－２、Ｈ１－３、Ｈ１－４、Ｈ１－５、Ｈ１－６、Ｈ１－７、Ｈ１－８、Ｈ１－９、Ｈ１－１０、Ｈ２－１、Ｈ２－２、Ｈ２－３、Ｈ２－４、Ｈ２－５、Ｈ２－６、Ｈ２－７、Ｈ２－８、Ｈ２－９、Ｈ２－１０、Ｈ２－１１、Ｈ２－１２、Ｈ２－１３、Ｈ２－１４、もしくはＨ２－１５のうちの少なくとも１つが、ホスホロチオエート連結を含まない、のうちの少なくとも１つが真である、組成物である。

【０１０７】
実施形態４８は、配列番号４５０を含む、実施形態４７の組成物である。

【０１０８】
実施形態４９は、細胞または対象においてＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）または一本鎖切断を誘導する際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１０９】
実施形態５０は、細胞または対象においてＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１０】
実施形態５１は、対象においてＨＡＥを治療または予防する際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１１】
実施形態５２は、対象において血清および／または血漿ブラジキニン濃度を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１２】
実施形態５３は、対象においてブラジキニン媒介性血管拡張濃度を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１３】
実施形態５４は、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン媒介性血管拡張、腫脹、または血管浮腫、気道の閉塞、または窒息を治療または予防する際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１４】
実施形態５５は、ＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫、またはＨＡＥに関連する血管浮腫を治療または予防する際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１５】
実施形態５６は、血管浮腫発作の頻度を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１６】
実施形態５７は、血管浮腫発作の重症度を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１７】
実施形態５８は、発作の頻度および／もしくは重症度を低下させる際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１８】
実施形態５９は、血管浮腫発作の寛解を達成する際に使用するための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。

【０１１９】
実施形態６０は、ＨＡＥ発作の頻度および／もしくは重症度を低下させる際に使用する

ための、実施形態２９～４８のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１２０】
実施形態６１は、ＨＡＥ発作の頻度を低下させる際に使用するための、実施形態６０の組成物である。
【０１２１】
実施形態６２は、頻度を、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも６０～８０％、または少なくとも４０～９０％低下させる、実施形態６１の組成物である。
【０１２２】
実施形態６３は、頻度を、少なくとも６０～８０％低下させる、実施形態６１の方法である。
【０１２３】
実施形態６４は、頻度を、少なくとも４０～９０％低下させる、実施形態６１の方法である。
【０１２４】
実施形態６５は、総血漿カリクレイン活性を低下させる際に使用するための、実施形態６０の組成物である。
【０１２５】
実施形態６６は、総血漿カリクレインレベルを低下させる際に使用するための、実施形態６０の組成物である。
【０１２６】
実施形態６７は、プレカリクレインおよび／もしくはカリクレインレベルを低下させる際に使用するための、実施形態６０の組成物である。
【０１２７】
実施形態６８は、編集率において用量依存的な増加が存在する、実施形態６５～６７のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１２８】
実施形態６９は、総血漿カリクレインレベルにおいて用量依存的な低下が存在する、実施形態６５～６８のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１２９】
実施形態７０は、血漿カリクレイン活性において用量依存的な低下が存在する、実施形態６５～６９のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１３０】
実施形態７１は、効果が、投与後少なくとも１ヶ月、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年、１０年、またはさらに長く持続する、実施形態２９～７０のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１３１】
実施形態７２は、効果が、少なくとも６ヶ月持続する、実施形態２９～７１のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１３２】
実施形態７３は、効果が、少なくとも１年持続する、実施形態２９～７２のうちのいずれか１つの組成物である。
【０１３３】
実施形態７４は、さらに
ａ．細胞または対象においてＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導すること、
ｂ．細胞または対象においてＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させること、
ｃ．対象においてＨＡＥを治療もしくは予防すること、
ｄ．対象において血清および／もしくは血漿ブラジキニン濃度を低下させること、
ｅ．ブラジキニン産生を低下させること、

ｆ．ブラジキニン媒介性血管拡張を低下させること、
ｇ．ブラジキニン媒介性腫脹および血管浮腫を治療もしくは予防すること、ならびに／または
ｈ．腫脹によって引き起こされる気道の閉塞もしくは窒息を治療もしくは予防することを含む、実施形態１～２８のうちのいずれか１つの方法である。

【０１３４】
実施形態７５は、組成物が、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡ産生を減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１３５】
実施形態７６は、組成物が、血漿および血清におけるプレカリクレインタンパク質レベルを減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１３６】
実施形態７７は、組成物が、血漿および血清における総カリクレイン（プレカリクレインおよびｐＫａｌ）タンパク質レベルを減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１３７】
実施形態７８は、組成物が、クエン酸血清またはクエン酸血漿における総ＨＭＷＫと比較して、循環する切断ＨＭＷＫ（ｃＨＭＷＫ）の割合を減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１３８】
実施形態７９は、組成物が、クエン酸血漿におけるｃＨＭＷＫの対象の割合を、総ＨＭＷＫの３０％未満まで低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１３９】
実施形態８０は、組成物が、血清または血漿における自発的ｐＫａｌ活性を減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４０】
実施形態８１は、組成物が、カリクレイン活性を減少させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４１】
実施形態８２は、カリクレイン活性が、総カリクレイン活性、プレカリクレイン活性、および／またはｐＫａｌ活性を含む、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４２】
実施形態８３は、組成物が、方法または組成物の使用の前に、対象のｐＫａｌ活性を少なくとも約４０％低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４３】
実施形態８４は、組成物が、方法または組成物の使用の前に、対象のｐＫａｌ活性を少なくとも約５０％低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４４】
実施形態８５は、組成物が、方法または組成物の使用の前に、対象のｐＫａｌ活性を少なくとも約６０％低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４５】
実施形態８６は、組成物が、対象のｐＫａｌ活性を、基底レベルの約４０％未満まで低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１４６】
実施形態８７は、組成物が、対象のｐＫａｌ活性を、基底レベルの約４０～５０％まで低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１４７】
実施形態８８は、組成物が、対象のｐＫａｌ活性を、基底レベルの２０～４０％または２０～５０％まで低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１４８】
実施形態８９は、組成物が、血清および／または血漿ブラジキニンレベルを増加させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１４９】
実施形態９０は、組成物が、ＫＬＫＢ１遺伝子の編集を引き起こす、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５０】
実施形態９１は、編集が、編集される集合の割合（編集率）として計算される、実施形態９０の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５１】
実施形態９２は、編集率が、集合の３０～９９％である、実施形態９１の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５２】
実施形態９３は、編集率が、集合の３０～３５％、３５～４０％、４０～４５％、４５～５０％、５０～５５％、５５～６０％、６０～６５％、６５～７０％、７０～７５％、７５～８０％、８０～８５％、８５～９０％、９０～９５％、または９５～９９％である、実施形態９１の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５３】
実施形態９４は、組成物が、血清および／または血漿ブラジキニン濃度を低下させる、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５４】
実施形態９５は、組成物が、血清および／または血漿ブラジキニン濃度を低下させ、血清および／または血漿ブラジキニン濃度の低下が、四肢、顔、ＧＩ管、または気道を含む臓器組織における腫脹の減少を引き起こす、いずれか１つの先行する実施形態の方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５５】
実施形態９６は、ガイド配列が、
ａ．配列番号１～１４９、または
ｂ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１、または
ｃ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つ、または
ｄ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｅ．（ｄ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｆ．（ｄ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列から選択される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０１５６】
実施形態９７は、組成物が、
ａ．配列番号１、７、８、１５、２６、２７、２８、４１、４２、４６、５１、５２、５３、５６、６９、７１、または

ｂ．配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つ、または
ｃ．表１に列挙されるゲノム座標の１５個の連続ヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列、または
ｄ．（ｃ）からの配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチド、または
ｅ．（ｃ）から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、もしくは８５％同一であるガイド配列を含むｓｇＲＮＡを含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１５７】
実施形態９８は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、またはエクソン８、エクソン９、エクソン１０、エクソン１１、エクソン１２、エクソン１３、エクソン１４、もしくはエクソン１５の中にある、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０１５８】
実施形態９９は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１５９】
実施形態１００は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン３の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６０】
実施形態１０１は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン４の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６１】
実施形態１０２は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン５の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６２】
実施形態１０３は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン６の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６３】
実施形態１０４は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン８の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６４】
実施形態１０５は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン９の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６５】
実施形態１０６は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１０の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６６】
実施形態１０７は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１１の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６７】
実施形態１０８は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１２の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６８】
実施形態１０９は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１３の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１６９】
実施形態１１０は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１４の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１７０】
実施形態１１１は、標的配列が、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１５の中にある、実施形態９８の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７１】
実施形態１１２は、ガイド配列が、ＫＬＫＢ１のプラス鎖内の標的配列に対して相補的である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７２】
実施形態１１３は、ガイド配列が、ＫＬＫＢ１のマイナス鎖内の標的配列に対して相補的である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７３】
実施形態１１４は、第１のガイド配列が、ＫＬＫＢ１遺伝子のプラス鎖内の第１の標的配列に対して相補的であり、組成物が、ＫＬＫＢ１遺伝子のマイナス鎖内の第２の標的配列に対して相補的である第２のガイド配列をさらに含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７４】
実施形態１１５は、ガイドＲＮＡが、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つから選択されるガイド配列を含み、配列番号１７０のヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号１７０のヌクレオチドが、その３’末端にあるガイド配列の後にある、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７５】
実施形態１１６は、ガイドＲＮＡが、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つから選択されるガイド配列を含み、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、または配列番号４００～４５０のうちのいずれか１つのヌクレオチド配列をさらに含み、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３のヌクレオチド、または表４からのｓｇＲＮＡの保存部分のうちのいずれか１つが、その３’末端にあるガイド配列の後にある、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７６】
実施形態１１７は、ガイドＲＮＡが、シングルガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７７】
実施形態１１８は、ｓｇＲＮＡが、配列番号８、１５、４１、５１、６９のうちのいずれか１つを含むガイド配列を含む、実施形態１１７の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７８】
実施形態１１９は、ガイドＲＮＡが、配列番号３００のパターンに従って修飾され、Ｎが、まとめて、表１のガイド配列（配列番号１～１４９）のうちのいずれか１つである、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１７９】
実施形態１２０は、配列番号３００の各Ｎが、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎが、ガイド配列を形成し、ガイド配列が、ＫＬＫＢ１遺伝子に対してＣａｓ９を標的とする、実施形態１１９の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１８０】
実施例１２１は、ｓｇＲＮＡが、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つと、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３のヌクレオチド、または表４からのｓｇＲＮＡの保存部分のいずれかを含み、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３のヌクレオチド、または表４からのｓｇＲＮＡの保存部分のいずれかが、その３

’末端にあるガイド配列の後にある、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８１】

実施形態１２２は、ｓｇＲＮＡが、配列番号１～１４９から選択される配列に対して少なくとも９５％、９０％、または８５％同一であるガイド配列を含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８２】

実施形態１２３は、ｓｇＲＮＡが、配列番号８、１５、４１、５１、６９から選択される配列を含む、実施形態１２２の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８３】

実施形態１２４は、ガイドＲＮＡが、少なくとも１つの修飾を含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８４】

実施形態１２５は、少なくとも１つの修飾が、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１２４の方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８５】

実施形態１２６は、ヌクレオチド間ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を含む、実施形態１２４～１２５のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８６】

実施形態１２７は、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１２４～１２６のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８７】

実施形態１２８は、ガイドＲＮＡの５’末端での最初の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上における修飾を含む、実施形態１２４～１２７のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８８】

実施形態１２９は、ガイドＲＮＡの３’末端での最後の５個のヌクレオチドのうちの１つ以上における修飾を含む、実施形態１２４～１２８のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１８９】

実施形態１３０は、ガイドＲＮＡの最初の４個のヌクレオチドの間にＰＳ結合を含む、実施形態１２４～１２９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１９０】

実施形態１３１は、ガイドＲＮＡの最後の４個のヌクレオチドの間にＰＳ結合を含む、実施形態１２４～１３０のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１９１】

実施形態１３２は、ガイドＲＮＡの５’末端での最初の３個のヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１２４～１３１のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１９２】

実施形態１３３は、ガイドＲＮＡの３’末端での最後の３個のヌクレオチドに２’－Ｏ－Ｍｅ修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１２４～１３２のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０１９３】

実施形態１３４は、ガイドＲＮＡが、配列番号３００の修飾ヌクレオチドを含む、実施形態１２４～１３３のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物で

ある。
【０１９４】
実施形態１３５は、組成物が、薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１９５】
実施形態１３６は、ガイドＲＮＡが、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と会合している、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１９６】
実施形態１３７は、ＬＮＰが、陽イオン性脂質を含む、実施形態１３６の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１９７】
実施形態１３８は、陽イオン性脂質が、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエートであり、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエートとも呼ばれる、実施形態１３７の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１９８】
実施形態１３９は、ＬＮＰが、中性脂質を含む、実施形態１３６～１３８のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０１９９】
実施形態１４０は、中性脂質が、ＤＳＰＣである、実施形態１３９の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２００】
実施形態１４１は、ＬＮＰが、ヘルパー脂質を含む、実施形態１３６～１４０のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０１】
実施形態１４２は、ヘルパー脂質が、コレステロールである、実施形態１４１の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０２】
実施形態１４３は、ＬＮＰが、ステルス脂質を含む、実施形態１３６～１４２のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０３】
実施形態１４４は、ステルス脂質が、ＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧである、実施形態１４３の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０４】
実施形態１４５は、組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をさらに含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０５】
実施形態１４６は、組成物が、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をコードするｍＲＮＡをさらに含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０６】
実施形態１４７は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤が、Ｃａｓ９である、実施形態１４５または１４６の方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０７】
実施形態１４８は、組成物が、薬学的製剤であり、薬学的に許容可能な担体をさらに含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２０８】
実施形態１４９は、組成物が、配列番号１～１４９から選択される配列を含み、配列番号１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２０９】
実施形態１５０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１０】
実施形態１５１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１１】
実施形態１５２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１２】
実施形態１５３は、配列番号１～１４９から選択される配列が、配列番号５である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１３】
実施形態１５４は、配列番号１～１４９から選択される配列が、配列番号６である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１４】
実施形態１５５は、配列番号１～１４９から選択される配列が、配列番号７である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１５】
実施形態１５６は、組成物が、配列番号１～１４９から選択される配列を含み、配列番号８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１６】
実施形態１５７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１７】
実施形態１５８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１８】
実施形態１５９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２１９】
実施形態１６０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２２０】
実施形態１６１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

１３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２１】

実施形態１６２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２２】

実施形態１６３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２３】

実施形態１６４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２４】

実施形態１６５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２５】

実施形態１６６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２６】

実施形態１６７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２７】

実施形態１６８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２８】

実施形態１６９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２２９】

実施形態１７０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２３０】

実施形態１７１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２３１】

実施形態１７２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２３２】

実施形態１７３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２３３】
実施形態１７４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３４】
実施形態１７５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３５】
実施形態１７６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３６】
実施形態１７７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号２９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３７】
実施形態１７８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３８】
実施形態１７９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２３９】
実施形態１８０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４０】
実施形態１８１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４１】
実施形態１８２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４２】
実施形態１８３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４３】
実施形態１８４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４４】
実施形態１８５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２４５】
実施形態１８６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

３８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２４６】

実施形態１８７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号３９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２４７】

実施形態１８８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２４８】

実施形態１８９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２４９】

実施形態１９０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５０】

実施形態１９１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５１】

実施形態１９２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５２】

実施形態１９３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５３】

実施形態１９４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５４】

実施形態１９５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５５】

実施形態１９６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５６】

実施形態１９７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号４９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５７】

実施形態１９８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２５８】
実施形態１９９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２５９】
実施形態２００は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６０】
実施形態２０１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６１】
実施形態２０２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６２】
実施形態２０３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６３】
実施形態２０４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６４】
実施形態２０５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６５】
実施形態２０６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６６】
実施形態２０７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号５９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６７】
実施形態２０８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６８】
実施形態２０９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２６９】
実施形態２１０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２７０】
実施形態２１１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

６３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７１】

実施形態２１２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７２】

実施形態２１３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７３】

実施形態２１４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７４】

実施形態２１５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７５】

実施形態２１６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７６】

実施形態２１７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号６９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７７】

実施形態２１８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７８】

実施形態２１９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２７９】

実施形態２２０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２８０】

実施形態２２１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２８１】

実施形態２２２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２８２】

実施形態２２３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２８３】
実施形態２２４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８４】
実施形態２２５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８５】
実施形態２２６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８６】
実施形態２２７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号７９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８７】
実施形態２２８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８８】
実施形態２２９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２８９】
実施形態２３０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９０】
実施形態２３１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９１】
実施形態２３２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９２】
実施形態２３３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９３】
実施形態２３４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９４】
実施形態２３５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０２９５】
実施形態２３６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

８８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２９６】

実施形態２３７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号８９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２９７】

実施形態２３８は、配列番号１～１４９１～１４９から選択される配列が、配列番号９０である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２９８】

実施形態２３９は、配列番号１～１４９１～１４９から選択される配列が、配列番号９１である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０２９９】

実施形態２４０は、配列番号１～１４９１～１４９から選択される配列が、配列番号９２である、実施形態１～８９のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３００】

実施形態２４１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０１】

実施形態２４２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０２】

実施形態２４３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０３】

実施形態２４４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０４】

実施形態２４５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０５】

実施形態２４６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０６】

実施形態２４７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号９９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０７】

実施形態２４８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１００である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３０８】
実施形態２４９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３０９】
実施形態２５０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１０】
実施形態２５１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１１】
実施形態２５２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１２】
実施形態２５３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１３】
実施形態２５４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１４】
実施形態２５５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１５】
実施形態２５６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１６】
実施形態２５７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１０９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１７】
実施形態２５８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１８】
実施形態２５９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３１９】
実施形態２６０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３２０】
実施形態２６１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

１１３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２１】

実施形態２６２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２２】

実施形態２６３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２３】

実施形態２６４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２４】

実施形態２６５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２５】

実施形態２６６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２６】

実施形態２６７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１１９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２７】

実施形態２６８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２８】

実施形態２６９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３２９】

実施形態２７０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３３０】

実施形態２７１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３３１】

実施形態２７２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３３２】

実施形態２７３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３３３】
実施形態２７４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３４】
実施形態２７５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３５】
実施形態２７６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３６】
実施形態２７７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１２９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３７】
実施形態２７８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３８】
実施形態２７９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３３９】
実施形態２８０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４０】
実施形態２８１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４１】
実施形態２８２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４２】
実施形態２８３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４３】
実施形態２８４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４４】
実施形態２８５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。
【０３４５】
実施形態２８６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号

１３８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３４６】

実施形態２８７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１３９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３４７】

実施形態２８８は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３４８】

実施形態２８９は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４１である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３４９】

実施形態２９０は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４２である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５０】

実施形態２９１は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４３である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５１】

実施形態２９２は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４４である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５２】

実施形態２９３は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４５である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５３】

実施形態２９４は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４６である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５４】

実施形態２９５は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４７である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５５】

実施形態２９６は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４８である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５６】

実施形態２９７は、配列番号１～１４９から選択される配列を含む組成物が、配列番号１４９である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５７】

実施形態２９８は、ガイド配列が、配列番号３１０～３８６から選択される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５８】

実施形態２９９は、ガイド配列が、配列番号３１０～３１１、３１３～３２６、３２９～３３７、３３９～３４２、３４４～３４６、３４８、３５０、３５２～３５６、３６１、３６２、３６４、３６５、３６６、３６７、３６９～３７４、３７６～３８０、および３８２～３８６から選択される、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３５９】

実施形態３００は、ガイド配列が、配列番号３１０～３８６から選択され、配列番号３１０である、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３６０】

実施形態３０１は、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列、および表４のｓｇＲＮＡの保存部分のうちのいずれか１つを含むｓｇＲＮＡを含み、任意選択で配列番号４５０の修飾パターン、または表４の修飾パターンのうちのいずれか１つを有し、任意選択でｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾を含む、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、使用のための組成物、または組成物である。

【０３６１】

実施形態３０２は、組成物が、単回用量として投与される、実施形態１～３０１のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０３６２】

実施形態３０３は、組成物が、一度投与される、実施形態１～３０１のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０３６３】

実施形態３０４は、単回用量または一度投与が、

ａ．細胞もしくは対象においてＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導し、ならびに／または

ｂ．細胞もしくは対象においてＫＬＫＢ１遺伝子の発現を低下させ、ならびに／または

ｃ．対象においてＨＡＥを治療もしくは予防し、ならびに／または

ｄ．対象においてＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫、もしくはＨＡＥに関連する血管浮腫を治療もしくは予防し、ならびに／または

ｅ．対象において血清および／もしくは血漿ブラジキニン濃度を低下させ、

ｆ．ブラジキニン媒介性血管拡張を低下させ、

ｇ．ブラジキニン媒介性腫脹および血管浮腫を治療もしくは予防し、ならびに／または

ｈ．腫脹によって引き起こされる気道の閉塞もしくは窒息を治療もしくは予防する、実施形態３０２または３０３のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０３６４】

実施形態３０５は、単回用量または一度投与が、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週間にわたって、ａ）～ｈ）のうちのいずれか１つ以上を達成する、実施形態３０４の方法または組成物である。

【０３６５】

実施形態３０６は、単回用量または一度投与が、持続的な効果を達成する、実施形態３０４の方法または組成物である。

【０３６６】

実施形態３０７は、持続的な効果を達成することをさらに含む、実施形態１～３０６のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。

【０３６７】

実施形態３０８は、持続的な効果が、少なくとも１ヶ月、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも１年、または少なくとも５年持続する、実施形態３０７の方法、組

成物、または使用のための組成物である。
【０３６８】
実施形態３０９は、組成物の投与によって、カリクレイン活性、総血漿カリクレインレベル、プレカリクレインおよび／もしくはカリクレインレベル、または血清および／もしくは血漿におけるブラジキニンの治療に関連する低下が得られる、実施形態１～３０８のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０３６９】
実施形態３１０は、組成物の投与によって、治療範囲内の血清および／または血漿ブラジキニンレベルが得られる、実施形態１～３０９のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０３７０】
実施形態３１１は、組成物の投与によって、正常範囲の１００、１２０、または１５０％以内の血清および／または血漿ブラジキニンレベルが得られる、先行する実施形態のうちのいずれか１つの方法、組成物、または使用のための組成物である。
【０３７１】
実施形態３１２は、ＨＡＥを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７２】
実施形態３１３は、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防するための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７３】
実施形態３１４は、ＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫、またはＨＡＥに関連する血管浮腫を治療または予防するための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７４】
実施形態３１５は、血管浮腫発作の頻度を低下させるための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７５】
実施形態３１６は、血管浮腫発作の重症度を低下させるための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７６】
実施形態３１７は、ＨＡＥ発作の頻度および／または重症度を低下させるための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７７】
実施形態３１８は、血管浮腫発作の寛解を達成するための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【０３７８】
実施形態３１９は、例えば、少なくとも１ヶ月、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年、１０年、またはさらに長く維持される、持続性寛解を達成するための医薬の調製のための、先行する組成物の実施形態のいずれかの組成物の使用である。
【図面の簡単な説明】
【０３７９】
【図１Ａ】初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）（図１Ａ～１Ｂ）および初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）（図１Ｃ～１Ｄ）において、ガイドＲＮＡを使用したＫＬＫＢ１遺伝子座内の様々な部位で検出された編集率（インデル頻度）を示す。
【図１Ｂ】（上記の通り。）
【図１Ｃ】（上記の通り。）
【図１Ｄ】（上記の通り。）
【図２Ａ】ＰＨＨ（図２Ａ～２Ｂ）およびＰＣＨ（図２Ｃ～２Ｄ）におけるＫＬＫＢ１

ｓｇＲＮＡの編集率（インデル頻度）を示す。
【図２Ｂ】（上記の通り。）
【図２Ｃ】（上記の通り。）
【図２Ｄ】（上記の通り。）
【図３Ａ】３つの異なるＰＨＨロット（ＨＵ８３００、ＨＵ８２８４、およびＨＵ８２９６）において、ＰＨＨをＫＬＫＢ１標的化ガイドＲＮＡでトランスフェクションした後の編集率（インデル頻度）（図３Ａ）、分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベル（図３Ｂ）、および相関プロット（図３Ｃ）を示す。
【図３Ｂ】（上記の通り。）
【図３Ｃ】（上記の通り。）
【図３Ｄ】（上記の通り。）
【図３Ｅ】（上記の通り。）
【図４Ａ】初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるＫＬＫＢ１ガイドの編集率（図４Ａ～４Ｂ）、および初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）におけるＫＬＫＢ１ガイドの編集率（図４Ｃ～４Ｄ）を示す。
【図４Ｂ】（上記の通り。）
【図４Ｃ】（上記の通り。）
【図４Ｄ】（上記の通り。）
【図５Ａ】ＰＨＨ（図５Ａ～５Ｄ）およびＰＣＨ（図５Ｅ～５Ｈ）における特定のガイド配列についての編集率および分泌カリクレインの用量応答データ、ならびにＰＨＨおよびＰＣＨにおける編集率および分泌タンパク質の相関プロット（図５Ｉ～５Ｊ）を示す。
【図５Ｂ】（上記の通り。）
【図５Ｃ】（上記の通り。）
【図５Ｄ】（上記の通り。）
【図５Ｅ】（上記の通り。）
【図５Ｆ】（上記の通り。）
【図５Ｇ】（上記の通り。）
【図５Ｈ】（上記の通り。）
【図５Ｉ】（上記の通り。）
【図５Ｊ】（上記の通り。）
【図６Ａ】ＰＨＨ（図６Ａ～６Ｂ）およびＰＣＨ（図６Ｃ～６Ｄ）における特定のガイド配列についてのインデル頻度の用量応答曲線データを提供する。
【図６Ｂ】（上記の通り。）
【図６Ｃ】（上記の通り。）
【図６Ｄ】（上記の通り。）
【図７Ａ】ＰＨＨ（図７Ａおよび７Ｃ）およびＰＣＨ（図７Ｂおよび７Ｄ）における特定のガイド配列についてのインデル頻度（図７Ａおよび７Ｂ）およびＫＬＫＢ１分泌（図７Ｃおよび７Ｄ）の用量応答曲線データ、ならびに分泌タンパク質を測定するためのウエスタンブロット分析（図７Ｅ）を示す。
【図７Ｂ】（上記の通り。）
【図７Ｃ】（上記の通り。）
【図７Ｄ】（上記の通り。）
【図７Ｅ】（上記の通り。）
【図８Ａ】Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスにおけるインビボでの様々な修飾ｓｇＲＮＡのＫＬＫＢ１編集％を示す。
【図８Ｂ】Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウス（実施例６）において、それぞれＥＬＩＳＡおよびエレクトロケミルミネッセンスベースアレイを使用して測定されるＫＬＫＢ１タンパク質レベルを示す。
【図８Ｃ】（上記の通り（図８Ｂの説明と同様）。）
【図８Ｄ】Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスにおける各配列のＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルの倍率

変化を示す。
【図９Ａ】ＫＬＫＢ１編集（図９Ａ）、血清ＫＬＫＢ１タンパク質（プレカリクレインおよびカリクレイン）（図９Ｂ）、治療マウスにおけるＴＳＳ率（図９Ｃ）、およびＫＬＫＢ１タンパク質率に対する肝臓編集率の相関（図９Ｄ）のレベルを示す。
【図９Ｂ】（上記の通り。）
【図９Ｃ】（上記の通り。）
【図９Ｄ】（上記の通り。）
【図１０】ＫＬＫＢ１遺伝子編集、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡのノックダウン率、およびＨｕＫＬＫＢ１マウスモデルにおける血漿カリクレインの用量依存的レベルを示す。
【図１１Ａ】Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおける、示される用量のｓｇＲＮＡで治療した後の用量応答アッセイにおけるＫＬＫＢ１遺伝子編集および血漿カリクレインのレベルを示す。
【図１１Ｂ】Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおける、示される用量のｓｇＲＮＡで治療した後での透過剤による治療に応答して、用量応答血管透過性アッセイにおいて、結腸試料からエバンスブルー（ＥＢ）色素を検出する６００ｎｍ光での吸光度のレベルを示す。
【図１２Ａ】カニクイザルにおいて、Ｇ０１３９０１とともに１．５ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、または６ｍｇ／ｋｇでＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９構成要素を単回用量投与した後の、それぞれ、循環総カリクレイン活性（図１２Ａ）およびタンパク質レベル（図１２Ｂ）のインビボでの用量依存的な低下を示す。
【図１２Ｂ】（上記の通り。）
【図１３Ａ】カニクイザルにおいて、Ｇ０１２２６７とともに示される投薬量でＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９構成要素を単回用量投与した後の、それぞれ、循環総カリクレイン活性（図１３Ａ）およびタンパク質レベル（図１３Ｂ）のインビボでの低下を示す。
【図１３Ｂ】（上記の通り。）
【図１４】例示的なｓｇＲＮＡ配列（配列番号２０１）における１０個の保存領域ＹＡ部位を１～１０でラベル付けされる。数字２５、４５、５０、５６、６４、６７、および８３は、（Ｎ）ｘとして示されるガイド領域を有するｓｇＲＮＡ中のＹＡ部位１、５、６、７、８、９、および１０のピリミジンの位置を示し、例えば、ｘは、任意選択で、２０である。
【図１５】下部ステム、バルジ、上部ステム、ネクサス（そのヌクレオチドは、５’から３’方向で、それぞれＮ１～Ｎ１８と称することができる）、ヘアピン１およびヘアピン２領域を含む、ｓｇＲＮＡの保存領域の個々のヌクレオチドを示すラベルが付けられた、可能な二次構造における例示的なｓｇＲＮＡ（配列番号４０１、全ての修飾は図示されていない）を示す。ヘアピン１とヘアピン２との間のヌクレオチドは、ｎでラベル付けされる。ガイド領域は、ｓｇＲＮＡ上に存在し得、この図ではｓｇＲＮＡの保存領域の前に「（Ｎ）ｘ」として示されている。
【発明を実施するための形態】
【０３８０】
ここで、本発明の特定の実施形態を詳細に参照し、本発明の実施形態の例は添付の図面で例示される。本発明は例示される実施形態と併せて説明されるが、それらは、本発明をそれらの実施形態に限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。逆に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義され、含まれる実施形態によって本発明内に含まれ得る全ての代替物、改変物、および均等物を網羅することが意図される。
【０３８１】
本教示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって変化し得ると理解されるべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の参照物を含めることに留意されたい。したがって、例えば、「コンジュゲート（ａ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）」への言及は、複数のコンジュゲートを含み、「細胞（ａ　ｃｅｌｌ）」への言及は

、複数の細胞を含む等である。
【０３８２】
数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値および測定可能な値は、有意な桁および測定に関連する誤差を考慮して、おおよその値であると理解される。また、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｓ）」、「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、および「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の使用は、限定することを意図するものではない。上述の概略的な説明と、以下の詳細な説明はいずれも例示であり、単に説明するためのものであり、その教示を限定するものではないことが理解されるべきである。
【０３８３】
本明細書に特に記載されていない限り、様々な構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「からなる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素を「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」か、またはそれら「から本質的になる」ものであると想定される。様々な構成要素「から本質的になる」と列挙する本明細書の実施形態はまた、その列挙された構成要素「からなる」か、またはそれらを「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」ものであると想定される（この互換性は、特許請求の範囲におけるこれらの用語の使用には適用されない）。
【０３８４】
「または」という用語は、文脈が別途明確に示さない限り、包括的な意味で、すなわち、「および／または」に等しい意味で使用される。
【０３８５】
本明細書で使用される章の見出しは、構成的な目的のみのためであり、所望の主題を決して限定するものとして解釈されるべきではない。参照により組み込まれる任意の材料が、本明細書で定義される任意の用語または本明細書の任意の他の明示的な内容と矛盾する場合、本明細書が優先する。本教示を様々な実施形態と併せて記載するが、本教示をそのような実施形態に限定することを意図するものではない。逆に、本教示は、当業者によって理解されるように、様々な代替、改変物、および均等物を包含する。
【０３８６】
Ｉ．定義
特に明記しない限り、本明細書で使用される以下の用語および句は、以下の意味を有することを意図する。
【０３８７】
「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、骨格に沿って一緒に連結された窒素系複素環式塩基または塩基類似体を有するヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体（従来のＲＮＡ、ＤＮＡ、混合ＲＮＡ－ＤＮＡ、およびそれらの類似体であるポリマーを含む）を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド－核酸結合（「ペプチド核酸」またはＰＮＡ、ＰＣＴ第９５／３２３０５号）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの１つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、２’メトキシまたは２’ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基（Ａ、Ｇ、Ｃ、Ｔ、Ｕ）、その類似体（例えば、５－メトキシウリジン、シュードウリジン、もしくはＮ１－メチルシュードウリジン等の修飾ウリジン）、イノシン、プリンもしくはピリミジンの誘導体（例えば、N^4－メチルデオキシグアノシン、デアザ－もしくはアザ－プリン、デアザ－もしくはアザ－ピリミジン、５位もしくは６位に置換基を有するピリミジン塩基（例えば、５－メチルシトシン）、２、６、もしくは８位に置換基を有するプリン塩基、２－アミノ－６－メチル

アミノプリン、O^6－メチルグアニン、４－チオ－ピリミジン、４－アミノ－ピリミジン、４－ジメチルヒドラジン－ピリミジン、およびO^4－アルキル－ピリミジン、米国特許第５，３７８，８２５号およびＰＣＴ第９３／１３１２１号）であってもよい。一般的な考察については、Ｔｈｅ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ５－３６、Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．編集、１１th ｅｄ．，１９９２を参照）。核酸は、骨格がポリマーの位置に窒素系塩基を含まない１つ以上の「脱塩基」残基を含み得る（米国特許第５，５８５，４８１号）。核酸は、従来のＲＮＡもしくはＤＮＡ糖、塩基および連結のみを含んでいてもよく、または従来の構成要素および置換の両方（例えば、２’メトキシ連結を有する従来の塩基、または従来の塩基および１つ以上の塩基類似体の両方を含有するポリマー）を含むことができる。核酸は、ＲＮＡ模倣糖構造にロックされた二環式フラノース単位を有し、相補的なＲＮＡおよびＤＮＡ配列に対するハイブリダイゼーション親和性を高める、１つ以上のＬＮＡヌクレオチドモノマーを含有する類似体である「ロックド核酸」（ＬＮＡ）を含む（Ｖｅｓｔｅｒ ａｎｄ Ｗｅｎｇｅｌ，２００４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ４３（４２）：１３２３３－４１）。ＲＮＡおよびＤＮＡは異なる糖部分を有し、ＲＮＡ内のウラシルもしくはその類似体およびＤＮＡ内のチミンもしくはその類似体の存在によって異なり得る。

【０３８８】

「ガイドＲＮＡ」、「ｇＲＮＡ」、および単に「ガイド」は、標的ＤＮＡに対してＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を指向させるガイドを指すために、本明細書で互換的に使用され、ｃｒＲＮＡ（ＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡとしても知られる）、またはｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡの組み合わせ（ｔｒａｃｒＲＮＡとしても知られる）のいずれかであり得る。ｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡは、一本鎖ＲＮＡ分子（シングルガイドＲＮＡ、ｓｇＲＮＡ）として会合し得るか、または２つの別々のＲＮＡ分子（デュアルガイドＲＮＡ、ｄｇＲＮＡ）において会合し得る。「ガイドＲＮＡ」または「ｇＲＮＡ」は、各種類を指す。ｔｒＲＮＡは、天然に存在する配列、または天然に存在する配列と比較して修飾もしくは多様性を有するｔｒＲＮＡ配列であり得る。

【０３８９】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に対して相補的であり、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤による結合または修飾（例えば、切断）のための標的配列に対してガイドＲＮＡを指向させるように機能する、ガイドＲＮＡ内の配列を指す。「ガイド配列」は、「標的化配列」または「スペーサー配列」とも称され得る。ガイド配列は、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ（すなわち、Ｓｐｙ Ｃａｓ９）および関連するＣａｓ９ホモログ／オルソログの場合、２０塩基対の長さであり得る。例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長のような、より短い配列またはより長い配列もまたガイドとして使用できる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、例えば、遺伝子内または染色体上にあり、例えば、ガイド配列に対して相補的である。いくつかの実施形態では、ガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であり得る。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号１～１４９から選択される配列の少なくとも１７、１８、１９、もしくは２０個の連続ヌクレオチドに対して約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列および標的配列は、１００％相補的または同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列と標的配列とは、少なくとも１個のミスマッチを含有していてもよい。例えば、ガイド配列および標的配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有していてもよく、標的配列の全長は、少なくとも１７、１８、１９、２０個、またはそれ以上の塩基対である。いくつかの実施形態では、ガイド配列および標的配列は、１～４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、少なくとも１７、１

８、１９、２０個、またはそれ以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列および標的配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含有していてもよく、ガイド配列は、２０個のヌクレオチドを含む。

【０３９０】

ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の核酸基質は二本鎖核酸であるので、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の標的配列は、ゲノムＤＮＡのプラス鎖とマイナス鎖（すなわち、与えられる配列と、配列の逆相補体）の両方を含む。したがって、ガイド配列が、「標的配列に対して相補的」であると言われる場合、標的配列の逆相補体に結合するようにガイドＲＮＡを指向させ得ると理解されるべきである。したがって、いくつかの実施形態では、ガイド配列が、標的配列の逆相補体に結合する場合、ガイド配列は、ガイド配列におけるＵのＴへの置換を除いて、標的配列の特定のヌクレオチド（例えばＰＡＭを含まない標的配列）と同一である。

【０３９１】

本明細書で使用される場合、「ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤」は、ＲＮＡおよびＤＮＡ結合活性を有するポリペプチドもしくはポリペプチドの複合体、またはそのような複合体のＤＮＡ結合サブユニットを意味し、ＤＮＡ結合活性は、配列特異的であり、ＲＮＡの配列に依存する。例示的なＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤には、Ｃａｓクリバーゼ（ｃｌｅａｖａｓｅ）／ニッカーゼおよびその不活性化形態（ｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤」）が含まれる。本明細書で使用される「Ｃａｓタンパク質」とも称される「Ｃａｓヌクレアーゼ」には、Ｃａｓクリバーゼ、Ｃａｓニッカーゼ、およびｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤が包含される。Ｃａｓクリバーゼ／ニッカーゼおよびｄＣａｓ　ＤＮＡ結合剤には、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のＣｓｍまたはＣｍｒ複合体、Ｃａｓ１０、Ｃｓｍ１、またはそのＣｍｒ２サブユニット、Ｉ型ＣＲＩＳＰＲ系のカスケード複合体、そのＣａｓ３サブユニットおよびクラス２Ｃａｓヌクレアーゼが含まれる。本明細書で使用される場合、「クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼ」は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合活性を有する一本鎖ポリペプチドである。クラス２Ｃａｓヌクレアーゼには、さらにＲＮＡ誘導ＤＮＡ切断酵素またはニッカーゼ活性を有するクラス２　Ｃａｓクリバーゼ／ニッカーゼ（例えば、Ｈ８４０Ａ、Ｄ１０Ａ、またはＮ８６３Ａバリアント）、およびクリバーゼ／ニッカーゼ活性が不活性化されている、クラス２ｄ　Ｃａｓ　ＤＮＡ結合剤が含まれる。クラス２　Ｃａｓヌクレアーゼには、例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２ｃ１、Ｃ２ｃ２、Ｃ２ｃ３、ＨＦ　Ｃａｓ９（例えば、Ｎ４９７Ａ、Ｒ６６１Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｑ９２６Ａバリアント）、ＨｙｐａＣａｓ９（例えば、Ｎ６９２Ａ、Ｍ６９４Ａ、Ｑ６９５Ａ、Ｈ６９８Ａバリアント）、ｅＳＰＣａｓ９（１．０）（例えば、Ｋ８１０Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）、およびｅＳＰＣａｓ９（１．１）（例えば、Ｋ８４８Ａ、Ｋ１００３Ａ、Ｒ１０６０Ａバリアント）タンパク質、ならびにそれらの修飾物が含まれる。Ｃｐｆ１タンパク質（Ｚｅｔｓｃｈｅｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１６３：１－１３（２０１５））は、Ｃａｓ９と相同性であり、ＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインを含む。ＺｅｔｓｃｈｅのＣｐｆ１配列は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅの表Ｓ１およびＳ３を参照。例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，１３（１１）：７２２－３６（２０１５）、Ｓｈｍａｋｏｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ，６０：３８５－３９７（２０１５）を参照されたい。

【０３９２】

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

【０３９３】

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

【０３９４】

「ｍＲＮＡ」は、ポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用され、ポリペプチドへと翻訳することができる（すなわち、リボソームおよびアミノアシル化ｔＲＮＡによる翻訳のための基質として機能し得る）オープンリーディングフレームを含む。ｍＲＮＡは、リボース残基またはその類似体を含むリン酸糖骨格（例えば、２’－メトキシリボース残基）を含むことができる。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡリン酸糖骨格の糖は、リボース残基、２’－メトキシリボース残基、またはそれらの組み合わせから本質的になる。

【０３９５】

本明細書に記載のガイドＲＮＡ組成物および方法に有用なガイド配列を、表１または表２、および本出願全体に示す。

【０３９６】

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

【０３９７】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物（例えば、タンパク質、ｍＲＮＡ、またはその両方）の発現の減少を指す。タンパク質のノックダウンは、目的の組織、流体、または細胞集合等の試料からタンパク質の総細胞量を検出することによって測定することができる。これは、タンパク質の代替物、マーカー、または活性を測定することによっても測定することができる。ｍＲＮＡのノックダウンを測定する方法は既知であり、目的の試料から単離されたｍＲＮＡのシークエンシングを含む。いくつかの実施形態では、「ノックダウン」は、特定の遺伝子産物の発現のいくつかの喪失、例えば、転写されるｍＲＮＡの量の減少、または細胞集合（組織に見られるもの等のインビボ集合を含む）によって発現されるタンパク質の量の減少を指し得る。

【０３９８】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」は、細胞における特定の遺伝子からの発現の喪失、または細胞における特定のタンパク質の喪失を指す。ノックアウトは、細胞、

組織、または細胞集合におけるタンパク質の総細胞量を検出することのいずれかによって測定することができる。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、１つ以上の試料、例えば、血清、血漿、組織、または細胞において（例えば、組織内で見出されるもの等のインビボ集合を含む細胞の集合において）ＫＬＫＢ１を「ノックアウトする」。いくつかの実施形態では、ノックアウトは、例えば、インデルによって作製される変異体ＫＬＫＢ１タンパク質の形成ではなく、細胞内のＫＬＫＢ１タンパク質の発現の完全な喪失である。本明細書で使用される場合、「ＫＬＫＢ１」は、一般に、ＫＬＫＢ１遺伝子の遺伝子産物であるプレカリクレインを指す。プレカリクレインは、血漿カリクレイン（ｐＫａｌ）に処理され、抗体は、ｐＫａｌ、プレカリクレイン、またはその両方を検出することができる。ヒト野生型ＫＬＫＢ１配列は、ＮＣＢＩ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ：３８１８、Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＧ００００００１６４３４４で入手可能である。「ＰＫＫ」、「ＰＰＫ」、「ＫＬＫ３」、および「ＰＫＫＤ」は、同義の遺伝子である。ヒトＫＬＫＢ１転写産物は、Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＴ００００００２６４６９０で入手可能であり、カニクイザル野生型ＫＬＫＢ１配列は、Ｅｎｓｅｍｂｌ：ＥＮＳＭＦＡＴ０００００００２３５５で入手可能である。

【０３９９】

「遺伝性血管浮腫」（ＨＡＥ）は、Ｃ１エステラーゼ阻害剤タンパク質（Ｃ１－ＩＮＨ）をコードするＳＥＲＰＩＮＧ１遺伝子の不活性化変異に起因して、重度の腫脹（血管浮腫）の再発事象を特徴とする炎症性障害である。Ｃ１－ＩＮＨは、（例えば、キニン系において）炎症を促進する特定のタンパク質の活性をブロックする。Ｃ１－ＩＮＨレベルの欠損によって、チェックされていない第ＸＩＩ因子（ＦＸＩＩ）および高レベルのカリクレインの活性化（ｐＫａｌ、ＫＬＫＢ１タンパク質（プレカリクレイン）から処理される）がもたらされる。カリクレインは、高分子量キニノーゲン（ＨＭＷＫ）を切断して、血管透過性に影響を与えるペプチドであるブラジキニンを放出する。血液中の過剰量のブラジキニンは、血管の壁を通って体組織に流体漏出を引き起こし、ＨＡＥを有する個人において腫脹がみられる。したがって、いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１活性を減少させる方法であって、減少させると、ブラジキニン産生が減少し、腫脹発作が低下する、方法が提供される。プレカリクレイン／カリクレイン、ＨＭＷＫおよびその切断生成物、ならびにＨＭＷＫの代理標識基質のタンパク質レベルを測定して、ＫＬＫＢ１ノックアウトの有効性を評価してもよい。

【０４００】

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

【０４０１】

本明細書で使用される場合、「ＹＡ部位」は、５’－ピリミジン－アデニン－３’ジヌクレオチドを指す。「保存領域ＹＡ部位」は、ｓｇＲＮＡの保存領域内に存在する。「ガイド領域ＹＡ部位」は、ｓｇＲＮＡのガイド領域内に存在する。ｓｇＲＮＡにおける非修飾ＹＡ部位は、ＲＮａｓｅ－Ａ様エンドヌクレアーゼ、例えば、ＲＮａｓｅ　Ａによる切断を受けやすい場合がある。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、その保存領域内に約１０個のＹＡ部位を含む。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、その保存領域内に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のＹＡ部位を含む。例示的な保存領域ＹＡ部位は、ｓｇＲＮＡ構造（図１５）に関連して、図１４（配列番号２０１）に示される。ガイド領域は、任意の数のＹＡ部位を含む任意の配列であり得るため、例示的なガイド領域ＹＡ部位は、図１４に示されていない。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、図１４に示されるＹＡ部位のうちの１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個を含む。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、以下の位置またはそのサブセットにおいて、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のＹＡ部位を含む。ＬＳ５－ＬＳ６、ＵＳ３－ＵＳ４、ＵＳ９－ＵＳ１０、ＵＳ１２－Ｂ３、ＬＳ７－ＬＳ８、ＬＳ１

２－Ｎ１、Ｎ６－Ｎ７、Ｎ１４－Ｎ１５、Ｎ１７－Ｎ１８、およびＨ２－２～Ｈ２－３。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位は修飾を含み、これは、ＹＡ部位のうちの少なくとも１個のヌクレオチドが修飾されていることを意味する。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジン（ピリミジン位置とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のアデニン（アデニン位置とも称される）は、修飾（アデニンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジン位置およびアデニン位置は、修飾を含む。

【０４０２】

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

【０４０３】

「ＫＬＫＢ１活性の治療に関連する低下」という用語は、ベースラインと比較して、血漿ＫＬＫＢ１活性の約６０％より大きい低下を意味し得る。Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ，２０１７，３７６：７１７－７２８、Ｆｅｒｒｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２０１９，８２－９１７を参照されたい。ＫＬＫＢ１活性は、多くの場合、総カリクレイン活性として測定され、プレカリクレインが試料中でカリクレインに変換され、総カリクレイン活性が、その試料について測定される。場合によっては、ＫＬＫＢ１活性低下の範囲は、ベースラインと比較して、血漿ＫＬＫＢ１活性の約６０～８０％の低下を意味し得る。対象における分析対象物の低下を計算するために、基底値は、対象から治療前試料を収集することによって得ることができる。場合によっては、試料は、血清試料である。特定の態様では、標的ＫＬＫＢ１活性低下は、ベースラインと比較して、総カリクレイン（プレカリクレインおよび血漿カリクレイン）活性の約６０％の低下である。例えば、治療範囲内のＫＬＫＢ１活性レベルを達成することは、総カリクレインをベースラインから約６０％より大きく低下させることを意味し得る。いくつかの実施形態では、「正常なカリクレインレベル」または「正常なカリクレイン範囲」が低下する。いくつかの実施形態では、カリクレイン活性の治療に関連する低下は、対象についての既定値の約０～６０％、０～５０％、０～４０％、０～３０％、０～２５％、０～２０％、０～１５％、０～１０％、または正常なカリクレイン活性レベルの１０～６０％、１０～５０％、１０～４０％、１０～３０％、１０～２０％、または２０～６０％、２０～５０％、２０～４０％、または２０～３０％％のレベルを達成する。ＫＬＫＢ１活性は、本明細書に記載のアッセイを含む、当該分野において既知のアッセイによって測定することができる。

【０４０４】

「標的ＫＬＫＢ１タンパク質低下」という用語は、本明細書で使用される場合、ベースラインと比較したｐＫａｌの標的レベルを意味する。ＫＬＫＢ１タンパク質レベルは、本明細書に記載されるような、ＥＬＩＳＡまたはウエスタンブロットアッセイ等の当該分野において既知のアッセイによって測定することができる。総ＫＬＫＢ１タンパク質は、プレカリクレインおよびカリクレインの両方を検出する抗体を用いて、ならびに／または試料中のプレカリクレインをカリクレインに変換した後で測定することができる。場合によっては、試料は、血清試料である。特定の態様では、標的ＫＬＫＢ１タンパク質低下は、ベースラインと比較して、総カリクレイン（プレカリクレインおよび血漿カリクレイン）の約６０％の低下である。いくつかの実施形態では、総カリクレインタンパク質の治療に関連する低下は、対象についての既定値の約０～６０％、０～５０％、０～４０％、０～３０％、０～２５％、０～２０％、０～１５％、０～１０％、または正常な総カリクレインタンパク質レベルの１０～６０％、１０～５０％、１０～４０％、１０～３０％、１０～２０％、または２０～６０％、２０～５０％、２０～４０％、または２０～３０％％の

レベルを達成する。

【０４０５】

総ＨＭＷＫの約３０％未満の循環血漿ｃＨＭＷＫレベルは、ラナデルマブで治療した患者におけるＨＡＥ発作の減少と関連していた（Ｂａｎｅｒｊｉ，ｅｔ　ａｌ，２０１７を参照されたい）。同じ試験では、健常な対照は、ｃＨＭＷＫの血漿レベルが総ＨＭＷＫの約８．３％であった。別の試験では、Ｓｕｆｆｒｉｔｉらは、正常対照では約３４．８％、寛解期のＨＡＥ患者では約４１．４％、発作中のＨＡＥ患者では約５８．１％の平均のｃＨＭＷＫ血漿レベルを見出した（Ｓｕｆｆｒｉｔｔｉ，ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ａｌｌｅｒｇｙ　２０１４；４４：１５０３－１４）。療法的治療は、約６０％未満の総ＨＭＷＫに対する循環血漿ｃＨＭＷＫの比率を標的にすることができる。いくつかの実施形態では、ＨＭＷＫに対するｃＨＭＷＫの比率は、約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、５０％より小さいか、またはそれより大きい値より小さい。

【０４０６】

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

【０４０７】

ＩＩ．組成物

Ａ．ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物

例えば、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系）を有するガイドＲＮＡを使用して、ＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）、一本鎖切断、および／または核酸修飾を引き起こす部位特異的結合を誘導するのに有用な組成物が本明細書に提供される。組成物は、ＨＡＥを有するか、またはＨＡＥを有する疑いのある対象に投与され得る。組成物は、例えば、血漿または血清におけるプレカリクレインタンパク質レベルの減少によって、血漿または血清における総カリクレイン（プレカリクレインおよびｐＫａｌ）タンパク質レベルの減少によって、循環切断ＨＭＷＫ（ｃＨＭＷＫ）の割合の減少によって、またはクエン酸血漿におけるｃＨＭＷＫの割合の減少によって測定されるような、増加した血清および／または血漿ブラジキニン濃度を有する対象に投与され得る。組成物は、増加した血清および／または血漿プレカリクレインおよび／またはカリクレイン濃度を有する対象に投与され得る。組成物は、増加した血清および／または血漿総カリクレイン濃度を有する対象に投与してもよい。組成物は、増加した血清および／または血漿カリクレイン活性を有する対象に投与してもよい。ＫＬＫＢ１遺伝子を標的とするガイド配列を、表１に配列番号１～１４９で示す。

【０４０８】

表１に配列番号１～１４９で示される各々のガイド配列は、ｃｒＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、その３’末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＵＧＣＵＧＵＵＵＵＧ（配列番号１６７）。ｓｇＲＮＡの場合、上述のガイド配列は、ｓｇＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでいてもよく、例えば、ガイド配列の３’末端に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号１７１）またはＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号１７２、４個の末端部のＵを含まない配列番号１７１である）。いくつかの実施形態では、配列番号１７１の４個の末端部のＵは存在しない。いくつかの実施形態では、配列番号１７１の４個の末端部のＵのうちの１、２、または３個のみが存在する。

【０４０９】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのい

ずれか１つと、ｃｒＲＮＡを形成するための追加のヌクレオチドと、を含み、例えば、その３’末端で、ガイド配列に続く以下の例示的なヌクレオチド配列を有する。５’から３’への配向で、ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣＵＵＵＵ（配列番号１７０）またはＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号１７３）。配列番号１７３は、以下の野生型ガイドＲＮＡ保存配列を参照して、８個のヌクレオチドを欠いている。ＧＵＵＵＵＡＧＡＧＣＵＡＧＡＡＡＵＡＧＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡＡＣＵＵＧＡＡＡＡＡＧＵＧＧＣＡＣＣＧＡＧＵＣＧＧＵＧＣ（配列番号１７２）。

【０４１０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のガイド配列と、ヘアピン領域を含む「ｓｇＲＮＡの保存部分」とを含み、ヘアピン領域が、少なくとも５～１０個のヌクレオチドまたは６～１０個のヌクレオチドを欠いている、ＫＬＫＢ１の短いシングルガイドＲＮＡ（ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡ）が提供される。特定の実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いシングルガイドＲＮＡのヘアピン領域は、ｓｇＲＮＡの保存部分を参照して、５～１０個のヌクレオチドを欠いている（例えば、表３Ｂおよび図１５のヌクレオチドＨ１－１～Ｈ２－１５）。特定の実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いシングルガイドＲＮＡのヘアピン１領域は、ｓｇＲＮＡの保存部分を参照して、５～１０個のヌクレオチドを欠いている（例えば、表３Ｂおよび図１５のヌクレオチドＨ１－１～Ｈ１－１２）。例えば、その内容が参照により、例えば、請求項１～１５にその全体が本明細書に組み込まれる、ＷＯ２０１９／２３７０６９を参照されたい。

【０４１１】

例示的な「ｓｇＲＮＡの保存部分」が表３Ａ（図１５も参照）に示されており、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９（「ｓｐｙＣａｓ９」（「ｓｐＣａｓ９」とも称される））ｓｇＲＮＡの「保存領域」を示す。１行目は、ヌクレオチドの番号付けを示し、２行目は、配列（例えば、配列番号５００）を示し、３行目は、「ドメイン」を示す。ＢｒｉｎｅｒＡＥ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｅｌｌ　５６：３３３－３３９（２０１４）は、本明細書で「ドメイン」と称されるｓｇＲＮＡの機能ドメインを記載しており、標的化を担う「スペーサー」ドメイン、「下部ステム」、「バルジ」、「上部ステム」（テトラループを含んでいてもよい）、「ネクサス」、および「ヘアピン１」および「ヘアピン２」ドメインを含む。Ｂｒｉｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．のページ３３４、図１Ａを参照のこと。

【０４１２】

表３Ｂは、本明細書で使用されるｓｇＲＮＡのドメインの概略図を提供する。表３Ｂにおいて、領域間の「ｎ」は、例えば、０～１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の可変数のヌクレオチドを表す。いくつかの実施形態では、ｎは０に等しい。いくつかの実施形態では、ｎは１に等しい。

【０４１３】

いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１　ｓｇＲＮＡは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９（「ｓｐｙＣａｓ９」）またはｓｐｙＣａｓ９等価物由来である。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来ではない（「非ｓｐｙＣａｓ９」）。いくつかの実施形態では、５～１０個のヌクレオチドまたは６～１０個のヌクレオチドが連続している。

【０４１４】

いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡは、表３Ａに示されるように、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９（「ｓｐｙＣａｓ９」）ｓｇＲＮＡの保存部分の少なくともヌクレオチド５４～５８（ＡＡＡＡＡ）を欠失している。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡは、例えばペアワイズまたは構造アラインメントによって決

定されるように、ｓｐｙＣａｓ９の保存部分のヌクレオチド５４～５８（ＡＡＡＡＡ）に対応するヌクレオチドを少なくとも欠失している非ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡである。いくつかの実施形態では、非ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡは、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ　Ｃａｓ９（「ｓａＣａｓ９」）ｓｇＲＮＡである。

【０４１５】

いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡは、ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡの保存部分の少なくともヌクレオチド５４～６１（ＡＡＡＡＡＧＵＧ）を欠失している。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡは、ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡの保存部分の少なくともヌクレオチド５３～６０（ＧＡＡＡＡＡＧＵ）を欠失している。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の短いｓｇＲＮＡは、ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡの保存部分のヌクレオチド５３～６０（ＧＡＡＡＡＡＧＵ）もしくはヌクレオチド５４～６１（ＡＡＡＡＡＧＵＧ）のうちの４、５、６、７、または８個のヌクレオチド、または例えばペアワイズまたは構造アラインメントによって決定される非ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡの保存部分の対応するヌクレオチドを欠いている。

【表１】

表１：ヒトＫＬＫＢ１標的化ガイド配列、染色体座標、およびヒトシングルガイドＲＮＡおよびデュアルガイドＲＮＡ、および代替カニクイ（ｃｙｎｏ）ザルシングルガイド

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（ｈｇ３８）	ヒトガイド配列	ヒトｓｇＲＮＡ	ヒトｄｇＲＮＡ	カニクイザルｓｇＲＮＡ	カニクイザルガイド配列番号
1	chr4:186228230-186228252	ACAGGAAACUGUAGCAAACA	G012253	CR005916	NA	NA
2	chr4:186228248-186228270	AUAGAUAAUUCACUUACCAC	G012254	CR005917	NA	NA
3	chr4:186232154-186232176	UACAUCCCCACCUCUGAAGA	G012255	CR005918	NA	NA
4	chr4:186251256-186251278	UCUUGAGGAGUAGAGGAACU	G012256	CR005922	NA	NA
5	chr4:186251308-186251330	ACCAGGUAAAGUUCUUUUGC	G012257	CR005924	NA	NA
6	chr4:186251489-186251511	GGGUAAAUUUUAGAAUGGCA	G012258	CR005925	NA	NA
7	chr4:186251504-186251526	AUUUACCCGGAGUUGACUU	G012259	CR005928	NA	NA
8	chr4:186251507-186251529	UACCCGGGAGUUGACUUUGG	G012260	CR005929	NA	NA
9	chr4:186251828-186251850	UCUUUGAGAUUGUGUAACAC	G012261	CR005931	NA	NA
10	chr4:186251829-186251851	CUUUGAGAUUGUGUAACACU	G012262	CR005932	NA	NA
11	chr4:186251830-186251852	UUUGAGAUUGUGUAACACUG	G012263	CR005933	NA	NA
12	chr4:186254748-186254770	UACAUACCAGUGUAAUUCAA	G012264	CR005943	NA	NA
13	chr4:186251784-186251806	CUCCAACUAGGAUUGCGUAU	G012265	CR005949	G013933	373
14	chr4:186251792-186251814	AGGAUUGCGUAUGGGACACA	G012266	CR005951	G013904	344
15	chr4:186251793-186251815	GGAUUGCGUAUGGGACACAA	G012267	CR005952	G013901	341
16	chr4:186238297-186238319	GUUACUCAGCACCUUUAUAG	G012268	CR005956	G013945	385
17	chr4:186238263-186238285	UGCCUAUUAAAGUACAGUCC	G012269	CR005959	NA	NA
18	chr4:186251772-186251794	CUAUGGAUGGUUCUCCAACU	G012270	CR005960	G013922	362
19	chr4:186254601-186254623	GAUGUUUGGCGCAUCUAUAG	G012271	CR005963	G013921	361
20	chr4:186254592-186254614	AUGCGCCAAACAUCCUGCAG	G012272	CR005970	G013885	325
21	chr4:186236785-186236807	CUCCUUUAUAAAUGUCUCGA	G012273	CR005979	G013905	345
22	chr4:186236863-186236885	UGUUACUGGUGCACCUUUUU	G012274	CR005982	NA	NA
23	chr4:186254593-186254615	GAUGCGCCAAACAUCCUGCA	G012275	CR005983	G013876	316
24	chr4:186232192-186232214	AUCUGGCAGUAUUGGGCAUU	G012276	CR005992	G013915	355

【表２】

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（hg38）	ヒトガイド配列	ヒトsgRNA	ヒトdgRNA	カニクイザルsgRNA	カニクイザルガイド配列番号
25	chr4:186236893-186236915	GCGUGGCAUAUGAAAAAAAC	G012277	CR005994	NA	NA
26	chr4:186236798-186236820	UAUAAAGGAGUUGAUAUGAG	G012278	CR005995	G013913	353
27	chr4:186236938-186236960	ACACCUUGAAUUGUACUCAC	G012279	CR005998	NA	NA
28	chr4:186232214-186232236	UGAGGUGCACAUUCCACCCA	G012280	NA	NA	NA
29	chr4:186232190-186232212	CUGGCAGUAUUGGGCAUUUG	G012281	NA	NA	NA
30	chr4:186232148-186232170	AAAACGCCUUCUUCAGAGGU	G012282	NA	NA	NA
31	chr4:186232227-186232249	UGAAUAGCAAACACCUUGGG	G012283	NA	NA	NA
32	chr4:186236821-186236843	AGUCAAUUUUAAUGUGUCUA	G012284	NA	NA	NA
33	chr4:186236850-186236872	GUGUUGAAGAAUGCCAAAAA	G012285	NA	NA	NA
34	chr4:186236910-186236932	UGCCUUGUGAAAUGUUUGCG	G012286	NA	NA	NA
35	chr4:186250265-186250287	GCAUCUUGCGUUCUCAGAUG	G012287	NA	G013927	367
36	chr4:186250276-186250298	UCUCAGAUGUGGAUGUUGCC	G012288	NA	NA	NA
37	chr4:186250306-186250328	CUCCAGAUGCUUUUGUGUGU	G012289	NA	NA	NA
38	chr4:186251325-186251347	UAUUAUCAAAUCACAUUACC	G012290	NA	NA	NA
39	chr4:186251271-186251293	CCAGAUAUGGUGUUUUCUUG	G012291	NA	NA	NA
40	chr4:186251300-186251322	AAGUUCUUUUGCAGGUUAAA	G012292	NA	NA	NA
41	chr4:186251620-186251642	UUUACUCCCAGAAGACUGUA	G012293	NA	NA	NA
42	chr4:186251492-186251514	UGCCAUUCUAAAAAUUUACCC	G012294	NA	NA	NA
43	chr4:186251572-186251594	UCAUCUUUGUGCAAGUCUCU	G012295	NA	NA	NA
44	chr4:186251510-186251532	UCUCCUCCAAAGUCAACUCC	G012296	NA	NA	NA
45	chr4:186252049-186252071	GGAGGAACAAACUCUUCUUG	G012297	NA	NA	NA
46	chr4:186252098-186252120	AGGUGAAGCUGACAGCUCAG	G012298	NA	NA	NA
47	chr4:186256046-186256068	CCAUCCGGUUACCCAACAGU	G012299	NA	G013931	371
48	chr4:186256042-186256064	UAUACCAACUGUUGGGUAAC	G012300	NA	G012300	NA
49	chr4:186256034-186256056	GCACAAUUUAUACCAACUGU	G012301	NA	NA	NA
50	chr4:186256059-186256081	AACCGGAUGGGGCUUCUCGA	G012302	NA	G013932	372

【表３】

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（hg38）	ヒトガイド配列	ヒトsgRNA	ヒトdgRNA	カニクイザルsgRNA	カニクイザルガイド配列番号
51	chr4:186256047-186256069	CAACUGUUGGGUAACCGGAU	G012303	NA	G013882	322
52	chr4:186256035-186256057	CACAAUUUAUACCAACUGUU	G012304	NA	G012304	NA
53	chr4:186256046-186256068	CCAACUGUUGGGUAACCGGA	G012305	NA	G013924	364
54	chr4:186256061-186256083	CUCCUUCGAGAAGCCCCAUC	G012306	NA	NA	NA
55	chr4:186256048-186256070	AACUGUUGGGUAACCGGAUG	G012307	NA	G013914	354
56	chr4:186256003-186256025	CCAAUAUGCCUACCUUCCAA	G012308	NA	NA	NA
57	chr4:186256015-186256037	GUGCUUGUGUCACCUUUGGA	G012309	NA	G013900	340
58	chr4:186256011-186256033	UUGUGUCACCUUUGGAAGGU	G012310	NA	NA	NA
59	chr4:186256019-186256041	AAUUGUGCUUGUGUCACCUU	G012311	NA	NA	NA
60	chr4:186255996-186256018	AAGGUAGGCAUAUUGGUUUU	G012312	NA	NA	NA
61	chr4:186257312-186257334	ACCCAACGGAUGGGUCUGUGC	G012313	NA	NA	NA
62	chr4:186257314-186257336	AGCCAGCACAGACCAUCCGU	G012314	NA	NA	NA
63	chr4:186257302-186257324	UUAUAAAAUAACCCAACGGA	G012315	NA	G012315	NA
64	chr4:186257326-186257348	CUGUGCUGGCUAUAAAGAAG	G012316	NA	NA	NA
65	chr4:186257261-186257283	CAUUCUUCAUUUGUUACCAA	G012317	NA	NA	NA
66	chr4:186257284-186257306	UAUAAUCUUGAUAUCUUUUC	G012318	NA	NA	NA
67	chr4:186257313-186257335	GCCAGCACAGACCAUCCGUU	G012319	NA	NA	NA
68	chr4:186257324-186257346	GUCUGUGCUGGCUAUAAAGA	G012320	NA	G012320	NA
69	chr4:186257325-186257347	UCUGUGCUGGCUAUAAAGAA	G012321	NA	NA	NA
70	chr4:186258130-186258152	GUCCAUGUACUCAGCGACUU	G012322	NA	G012322	NA
71	chr4:186258128-186258150	CACCAAAGUCGCUGAGUACA	G012323	NA	G012323	NA
72	chr4:186258050-186258072	ACACAAUGGAAUGUGGCGUU	G012324	NA	G012324	NA
73	chr4:186258068-186258090	UUUGGUGGGCAUCACCAGCU	G012325	NA	G012325	NA
74	chr4:186258204-186258226	CUCUGGACUGCUUCUCAUGC	G012326	NA	NA	NA
75	chr4:186258133-186258155	AAGUCGCUGAGUACAUGGAC	G012327	NA	G012327	NA
76	chr4:186258089-186258111	GGGUGAAGGCUGUGCCCGCA	G012328	NA	G013895	335

【表４】

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（hg38）	ヒトガイド配列	ヒトsgRNA	ヒトdgRNA	カニクイザルsgRNA	カニクイザルガイド配列番号
77	chr4:186258054-186258076	AAUGGAAUGUGGCGUUUGGU	G012329	NA	G012329	NA
78	chr4:186258037-186258059	UCCAUUGUGUUUGCAAACUA	G012330	NA	G013942	382
79	chr4:186258067-186258089	GUUUGGUGGGGCAUCACCAGC	G012331	NA	NA	NA
80	chr4:186258043-186258065	UUUGCAAACACAAUGGAAUG	G012332	NA	G013916	356
81	chr4:186258103-186258125	GACACCAGGUUGCUCCCUGC	G012333	NA	NA	NA
82	chr4:186258009-186258031	ACUGUGACUCAGGGAGAUUC	G012334	NA	G013943	383
83	chr4:186258099-186258121	UGUGCCCGCAGGGAGCAACC	G012335	NA	NA	NA
84	chr4:186258036-186258058	CCAUUGUGUUUGCAAACUAA	G012336	NA	G013929	369
85	chr4:186258088-186258110	GGGGUGAAGGCUGUGCCCGC	G012337	NA	NA	NA
86	chr4:186258117-186258139	GCGACUUUGGUGUAGACACC	G012338	NA	NA	NA
87	chr4:186258036-186258058	CCCUUAGUUUGCAAACACAA	G012339	NA	NA	NA
88	chr4:186258053-186258075	CAAUGGAAUGUGGCGUUUGG	G012340	NA	G012340	NA
89	chr4:186232230-186232252	AACUGAAUAGCAAACACCUU	NA	CR005919	NA	NA
90	chr4:186238351-186238373	ACAAUUACCAAUUUCUGAAA	NA	CR005920	NA	NA
91	chr4:186238352-186238374	UACAAUUACCAAUUUCUGAA	NA	CR005921	NA	NA
92	chr4:186251263-186251285	GGUGUUUUCUUGAGGAGUAG	NA	CR005923	NA	NA
93	chr4:186251490-186251512	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	NA	CR005926	G013884	324
94	chr4:186251494-186251516	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	NA	CR005927	G013925	365
95	chr4:186251801-186251823	UAUGGGACACAAGGGAGCUC	NA	CR005930	NA	NA
96	chr4:186252047-186252069	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	NA	CR005934	G013912	352
97	chr4:186252048-186252070	UGGAGGAACAAACUCUUCUU	NA	CR005935	NA	NA
98	chr4:186252056-186252078	CAAACUCUUCUUGGGGAGAG	NA	CR005936	NA	NA
99	chr4:186252123-186252145	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	NA	CR005937	G013886	326
100	chr4:186252124-186252146	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	NA	CR005938	G013938	378
101	chr4:186252134-186252156	GGUCACUCAUAGGACACCAG	NA	CR005939	G013946	386
102	chr4:186252135-186252157	GUCACUCAUAGGACACCAGU	NA	CR005940	G013896	336

【表５】

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（hg38）	ヒトガイド配列	ヒトsgRNA	ヒトdgRNA	カニクイザルsgRNA	カニクイザルガイド配列番号
103	chr4:186252163-186252185	ACUGCUGCCCACUGCUUUGA	NA	CR005941	NA	NA
104	chr4:186252171-186252193	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	NA	CR005942	G013902	342
105	chr4:186238286-186238308	AGGAACACCUACCGCUAUAA	NA	CR005944	G013871	311
106	chr4:186238265-186238287	CUCCGGGACUGUACUUUAAU	NA	CR005945	G013889	329
107	chr4:186251786-186251808	GUCCCAUACGCAAUCCUAGU	NA	CR005946	G013890	330
108	chr4:186238293-186238315	CUCAGCACCUUUAUAGCGGU	NA	CR005947	G013892	332
109	chr4:186238282-186238304	UAUAGCGGUAGGUGUUCCUC	NA	CR005948	G013874	314
110	chr4:186238266-186238288	CUAUUAAAGUACAGUCCCGG	NA	CR005950	G013875	315
111	chr4:186238308-186238330	GUGCUGAGUAACGUGGAAUC	NA	CR005953	G013883	323
112	chr4:186238301-186238323	UAUAAAGGUGCUGAGUAACG	NA	CR005954	G013878	318
113	chr4:186251783-186251805	UCUCCAACUAGGAUUGCGUA	NA	CR005955	G013908	348
114	chr4:186238281-186238303	AUAGCGGUAGGUGUUCCUCC	NA	CR005957	G013873	313
115	chr4:186233989-186234011	CUGCCAAAAGUACAUCGAAC	NA	CR005958	G013877	317
116	chr4:186238345-186238367	ACCAAUUUCUGAAAGGGCAC	NA	CR005961	NA	NA
117	chr4:186251755-186251777	GUGUUUCUUAAGAUUAUCUA	NA	CR005962	NA	NA
118	chr4:186238344-186238366	CCAAUUUCUGAAAGGGCACA	NA	CR005964	NA	NA
119	chr4:186251759-186251781	UUCUUAAGAUUAUCUAUGGA	NA	CR005965	G013940	380
120	chr4:186233988-186234010	CUGUUCGAUGUACUUUUGGC	NA	CR005966	NA	NA
121	chr4:186233987-186234009	UGUUCGAUGUACUUUUGGCA	NA	CR005967	G013880	320
122	chr4:186232209-186232231	GGUGGAAUGUGCACCUCAUC	NA	CR005968	G013939	379
123	chr4:186250308-186250330	GUCCGACACACAAAAGCAUC	NA	CR005969	G013894	334
124	chr4:186236877-186236899	AAACUGGCAGCGAAUGUUAC	NA	CR005971	G013930	370
125	chr4:186236908-186236930	UGCCACGCAAACAUUUCACA	NA	CR005972	NA	NA
126	chr4:186233992-186234014	GCACCUGUUCGAUGUACUUU	NA	CR005973	G013870	310
127	chr4:186254594-186254616	AGAUGCGCCAAACAUCCUGC	NA	CR005974	NA	NA
128	chr4:186232199-186232221	GCACCUCAUCUGGCAGUAUU	NA	CR005975	NA	NA

【表６】

配列番号（ヒト）	例示的なゲノム座標（ｈｇ３８）	ヒトガイド配列	ヒトｓｇＲＮＡ	ヒトｄｇＲＮＡ	カニクイザルｓｇＲＮＡ	カニクイザルガイド配列番号
129	chr4:186250262-186250284	CAUCUGAGAACGCAAGAUGC	NA	CR005976	G013934	374
130	chr4:186232196-186232218	AUGCCCAAUACUGCCAGAUG	NA	CR005977	NA	NA
131	chr4:186232200-186232222	UGCACCUCAUCUGGCAGUAU	NA	CR005978	G013944	384
132	chr4:186232258-186232280	AUGUCAUUGAUUGAACUUGC	NA	CR005980	G013936	376
133	chr4:186252031-186252053	ACAAGCACACGCAUUGUUGG	NA	CR005981	G013893	333
134	chr4:186254723-186254745	UAUCGCCUUGAUAAAACUCC	NA	CR005984	G013926	366
135	chr4:186251271-186251293	CCUCAAGAAAACACCAUAUC	NA	CR005985	G013906	346
136	chr4:186232149-186232171	AAACGCCUUCUUCAGAGGUG	NA	CR005986	NA	NA
137	chr4:186252028-186252050	AAAACAAGCACACGCAUUGU	NA	CR005987	G013891	331
138	chr4:186234001-186234023	CAUCGAACAGGUGCAGUUUC	NA	CR005988	G013879	319
139	chr4:186254587-186254609	GGCUUCCCCUGCAGGAUGUU	NA	CR005989	G013881	321
140	chr4:186234029-186234051	UUGAUGACCACAUUGCUUCA	NA	CR005990	G013937	377
141	chr4:186254728-186254750	AGGAGCCUGGAGUUUUAUCA	NA	CR005991	NA	NA
142	chr4:186236783-186236805	UGCCAUCGAGACAUUUAUAA	NA	CR005993	G013899	339
143	chr4:186232260-186232282	AGCAAGUUCAAUCAAUGACA	NA	CR005996	G013897	337
144	chr4:186234022-186234044	GGACAUUCCUUGAAGCAAUG	NA	CR005997	NA	NA
145	chr4:186250330-186250352	GUUGGGGUGAUAGGUGCAGA	NA	CR005999	NA	NA
146	chr4:186232147-186232169	GAAAACGCCUUCUUCAGAGG	NA	CR006000	NA	NA
147	chr4:186232144-186232166	UAUGAAAACGCCUUCUUCAG	NA	CR006001	NA	NA
148	chr4:186250277-186250299	CUCAGAUGUGGAUGUUGCCA	NA	CR006002	NA	NA
149	chr4:186254579-186254601	CUCUCCUAGGCUUCCCCUGC	NA	CR006003	NA	NA

【表７】

表２．カニクイザルＫＬＫＢ１標的化シングルガイド配列、染色体座標、およびヒトに対するガイド配列相同性

カニクイザルｓｇＲＮＡ	カニクイザル配列番号	例示的なゲノム座標（ｍｆ５）	カニクイザルガイド配列	ヒトガイドに対する相同性パーセント
G013870	310	chr5:185648888-185648908	GCACCUGCUCGACGUACUUU	90
G013871	311	chr5:185652966-185652986	AGGAACGCCUACCACUAUAA	90
G013872	312	chr5:185688465-185688485	UGAUGGAAACGCUCGGAUGC	NA
G013873	313	chr5:185652964-185652984	AUAGUGGUAGGCGUUCCUCC	90
G013874	314	chr5:185652965-185652985	UAUAGUGGUAGGCGUUCCUC	90
G013875	315	chr5:185652946-185652966	CUCUUAAAGCACAGUCCCGG	90
G013876	316	chr5:185684512-185684532	AAUGCGCCAAACAUCCGGUA	100
G013877	317	chr5:185648882-185648902	UUGCCAAAAGUACGUCGAGC	85
G013878	318	chr5:185652981-185653001	UAUAAAGGUGCUGAAUAACG	95
G013879	319	chr5:185648894-185648914	CGUCGAGCAGGUGCAAUUUC	85
G013880	320	chr5:185648883-185648903	UGCUCGACGUACUUUUGGCA	90
G013881	321	chr5:185684503-185684523	GGCUUCCCUUACCGGAUGUU	85
G013882	322	chr4:186256046-186256066	CAACUGUUGGGUAACUGGAU	100
G013883	323	chr5:185652988-185653008	GUGCUGAAUAACGUGGGAAUC	95
G013884	324	chr5:185680852-185680872	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	100
G013885	325	chr5:185684511-185684531	AUGCGCCAAACAUCCGGUAA	100
G013886	326	chr5:185681472-185681492	CUAUGAGUGACCCUCCCACAC	100
G013887	327	chr5:185679339-185679359	GGCAACAUCCACACAUCCGAGA	NA
G013888	328	chr5:185679426-185679446	UUACGUUCUAUACGAAUGCA	85
G013889	329	chr5:185652948-185652968	CUCCGGGACUGUGCUUUAAG	90
G013890	330	chr5:185681135-185681155	GUCCCAUAUGUAAUCCUAGU	90
G013891	331	chr5:185681374-185681394	AAAACAAGCUCACGCAUUGU	95
G013892	332	chr5:185652976-185652996	UUCAGCACCUUUAUAGUGGU	90
G013893	333	chr5:185681377-185681397	ACAAGCUCACGCAUUGUUGG	95
G013894	334	chr5:185679374-185679394	GUUCGACACACAAAAGCAUC	95
G013895	335	chr4:186258088-186258108	GGGCGAAGGCUGUGCCCGCA	100
G013896	336	chr5:185681481-185681501	GUCACUCAUAGGACACCAGU	100
G013897	337	chr5:185647160-185647180	AGCAAGUUCCAUCAAUGACA	95
G013898	338	chr5:185679413-185679433	AACGUAAAGAAGAGGCAGCU	100
G013899	339	chr5:185651465-185651485	UGCCACCGAGACAUUUAUAA	95
G013900	340	chr4:186256017-186256037	GUGUUUGUGUCACCUUUGGA	100

【表８】

カニクイザルｓｇＲＮＡ	カニクイザル配列番号	例示的なゲノム座標（ｍｆ５）	カニクイザルガイド配列	ヒトガイドに対する相同性パーセント
G013901	341	chr4:186251792-186251812	GGAUUACAUAUGGGACACAA	100
G013902	342	chr5:185681520-185681540	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	100
G013903	343	chr5:185684660-185684680	CAGUGUAAUUCAAAGGAGCC	100
G013904	344	chr5:185681138-185681158	AGGAUUACAUAUGGGACACA	100
G013905	345	chr5:185651470-185651490	UUCCUUUAUAAAUGUCUCGG	100
G013906	346	chr5:185680632-185680652	CCUCAAGAAAACACCACAUC	95
G013907	347	chr5:185688458-185688478	AGAGCAGUGAUGGAAACGCU	NA
G013908	348	chr5:185681129-185681149	UCUCCAACUAGGAUUACAUA	90
G013909	349	chr5:185680982-185681002	ACUCCCCAGAAGACUGUAAGG	NA
G013910	350	chr5:185679360-185679380	AGCAUCUGGGGCGAGAACUC	100
G013911	351	chr5:185679372-185679392	UCGACACACAAAAGCAUCUG	NA
G013912	352	chr5:185681393-185681413	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	100
G013913	353	chr4:186236797-186236817	UAUAAAGGAAUUGAUAUGAG	100
G013914	354	chr4:186256047-186256067	AACUGUUGGUAACUGGAUG	100
G013915	355	chr5:185647095-185647115	AUCUGGCAGUGCUGGGCGUU	100
G013916	356	chr4:186258042-186258062	CUUGCAAACACAAUGGAAUG	100
G013917	357	chr4:186251628-186251648	UCUCCUCCUUACAGUCUUCU	
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	NA
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	100
G013919	359	chr4:186258084-186258104	GGCACAGCCUUCGCCCCAGC	100
G013920	360	chr5:185647084-185647104	CUGGGCGUUCGGGGUGUACA	100
G013921	361	chr4:186254600-186254620	GAUGUUUGGCGCAUUUAUAG	100
G013922	362	chr4:186251771-186251791	CUUCGGAUGGUUCUCCCAACU	
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	NA
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	100
G013924	364	chr4:186256045-186256065	CCAACUGUUGGGUAACUGGA	
G013925	365	chr5:185680856-185680876	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	100
G013926	366	chr5:185684639-185684659	UAUCGCCUUAAUAAAAACUCC	95
G013926	366	chr4:186254722-186254742	UAUCGCCUUAAUAAAAACUCC	100
G013927	367	chr4:186250264-186250284	GCAUCUUGCCUUCUCGGAUG	
G013928	368	chr5:185679421-185679441	UCGUAUAGAACGUAAAGAAG	90
G013929	369	chr4:186258038-186258058	CCAUUGUGUUUGCAAGCUAA	100
G013930	370	chr5:185651562-185651582	AAAUUGGCAGCCGAAUGUUAU	90
G013930	370	chr4:186236879-186236899	AAAUUGGCAGCGAAUGUUAU	100

【表９】

カニクイザルｓｇＲＮＡ	カニクイザル配列番号	例示的なゲノム座標（ｍｆ５）	カニクイザルガイド配列	ヒトガイドに対する相同性パーセント
G013931	371	chr4:186256048-186256068	CCAUCCAGUUACCCAACAGU	100
G013932	372	chr4:186256058-186256078	AACUGGAUGGGGCUUCUCGA	100
G013933	373	chr5:185681130-185681150	CUCCAACUAGGAUUACAUAU	100
G013934	374	chr5:185679328-185679348	CAUCCGAGAAGGCAAGAUGC	90
G013935	375	chr4:186251536-186251556	UUGAAUGUGACUUUCGUUAA	100
G013936	376	chr5:185647161-185647181	AUGUCAUUGAUGGAACUUGC	95
G013937	377	chr5:185648925-185648945	UUGAUGACCACACUGCUUUA	90
G013938	378	chr5:185681470-185681490	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	100
G013939	379	chr5:185647112-185647132	GGUGGAAUGUGCACAUCAUC	95
G013940	380	chr5:185681105-185681125	UUCUUAAGAUUAUCUUCGGA	90
G013941	381	chr5:185685921-185685941	CCUUUGGAAGGUAGGCAUAU	100
G013942	382	chr4:186258039-186258059	UCCAUUGUGUUUUGCAAGCUA	100
G013943	383	chr4:186258008-186258028	CCUGUGACUCAGGGAGAUUC	100
G013944	384	chr5:185647103-185647123	UGCACAUCAUCUGGCAGUGC	85
G013945	385	chr4:186238299-186238319	GUUAUUCAGCACCUUUAUAG	100
G013946	386	chr5:185681480-185681500	GGUCACUCAUAGGACACCAG	100

【０４１６】

「ＧＯＸＸＸＸＸ」として上で特定したガイドＲＮＡは、配列番号３００のガイド構造内に、表１または表２の特定された２０ヌクレオチド標的配列を含むｓｇＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、表１または２のガイドＲＮＡおよび配列番号３００のヌクレオチドのうちのいずれか１つを含み、任意選択で、ｓｇＲＮＡは、表４に記載される修飾パターンのうちのいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、表１または２のガイドＲＮＡのうちのいずれか１つ、ならびに表４のｓｇＲＮＡの保存部分のいずれかを含み、任意選択で、表４に記載される修飾パターンのうちのいずれか１つを有する。

【表１０】

表３Ａ（ｓｐｙＣａｓ９　ｓｇＲＮＡの保存部分、配列番号５００）

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U
LS1-LS6						B1-B2		US1-US12												B2-B6				LS7-LS12					

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	G	U
ネクサス																		H1-1～H1-12											

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C
N	H2-1～H2-15														

【表１１】

表３Ｂ

5’末端部（n）		LS1-6					B1-2				US1-12					B3-6							
		下部ステム		n			バルジ		n		上部ステム				n	バルジ		n					

LS7-12				N1-18					H1-1～H1-12					H2-1～H2-15									
下部ステム		n		ネクサス		n			ヘアピン１		n			ヘアピン２					3’末端部			

【０４１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、ヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９等のＣａｓヌクレアーゼ）であってもよいＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を、ＫＬＫＢ１中の標的ＤＮＡ配列に指向させるガイド配列を含む１つ以上のガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む組成物を提供する。ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列を含むｃｒＲＮＡを含み得る。ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列の１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドを含むｃｒＲＮＡを含み得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、表１に示されるガイド配列の少なくとも１７、１８、１９、または２０個の連続ヌクレオチドに対して約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％

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

【０４１８】

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

【０４１９】

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

【０４２０】

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

【０４２１】

いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列を含む１つ以上のガイドＲＮＡを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列と、表４に示されるｓｇＲＮＡの任意の保存部分とを含む１つ以上のガイドＲＮＡを含み、任意選択で、表４に示されるｓｇＲＮＡのいずれかの修飾パターンを有し、任意選択で、ｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾（表４の構築物に既に示されていない場合）を含む、組成物が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列を含む１つ以上のガイドＲＮＡを含み、配列番号１７０、１７１、１７２または１７３のヌクレオチドが、その３’末端にあるガイド配列の後にある、組成物が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列を含み、配列番号１７０、１７１、１７２または１７３のヌクレオチドが、その３’末端にある、１つ以上のガイドＲＮＡは、配列番号３００のパターンに従って修飾される。

【０４２２】

いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列を含

む１つ以上のガイドＲＮＡを含む組成物が提供される。一態様では、本発明は、配列番号１～１４９の核酸のうちのいずれかに対して少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％同一であるガイド配列を含む、１つ以上のｇＲＮＡを含む組成物が提供される。

【０４２３】

他の実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか２つ以上から選択されるガイド配列を含む少なくとも１つ、例えば、少なくとも２つのｇＲＮＡを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、配列番号１～１４９の核酸のうちのいずれかに対して少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％同一であるガイド配列を各々含む少なくとも２つのｇＲＮＡを含む。

【０４２４】

本発明のガイドＲＮＡ組成物は、ＫＬＫＢ１遺伝子内の標的配列を認識する（例えばこれに対してハイブリダイズする）ように設計される。例えば、ＫＬＫＢ１標的配列は、ガイドＲＮＡを含む提供されるＣａｓ開裂によって認識され、切断され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓクリバーゼは、ガイドＲＮＡをＫＬＫＢ１遺伝子の標的配列に対して指向させてもよく、ガイドＲＮＡのガイド配列は、標的配列とハイブリダイズし、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓクリバーゼは、標的配列を切断する。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、１つ以上のガイドＲＮＡの選択は、ＫＬＫＢ１遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、１つ以上のガイド配列を含む組成物は、ヒト参照ゲノムｈｇ３８からの座標に従って、以下の表１に示される対応するゲノム領域に対して相補的なガイド配列を含む。さらなる実施形態のガイド配列は、本明細書で提供される表のうちのいずれかに列挙されるゲノム座標の近傍の配列に対して相補的であり得る。例えば、さらなる実施形態のガイド配列は、本明細書に開示される表のうちのいずれかに列挙されるゲノム座標の１５個の連続したヌクレオチド±１０個のヌクレオチドを含む配列に対して相補的であり得る。

【０４２６】

いかなる特定の理論にも拘束されることなく、遺伝子の特定の領域における変異（例えば、ヌクレアーゼ媒介性ＤＳＢの結果として生じるインデルに起因するフレームシフト変異）は、遺伝子の他の領域における変異よりも許容性が低くてもよく、したがって、ＤＳＢの位置は、もたらされ得るタンパク質ノックダウンの量または種類における重要な因子である。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をＫＬＫＢ１遺伝子内の特定の位置に指向させるために使用される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＫＬＫＢ１のエクソン１、エクソン３、エクソン４、エクソン５、エクソン６、エクソン８、エクソン９、エクソン１０、エクソン１１、エクソン１２、エクソン１３、エクソン１４、またはエクソン１５内の標的配列に対して相補的であるか、または相補性を有するガイド配列を有するように設計されている。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、ガイド配列は、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子内に存在する標的配列に対して少なくとも９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９４％、９３％、９２％、９１％、または９０％同一である。いくつかの実施形態では、標的配列は、ガイドＲＮＡのガイド配列に対して相補的であり得る。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡのガイド配列とそれに対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％であり得る。いくつかの実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列とは、１００％相補的であるか、または同一であり得る。他の実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列は、少なくとも１個のミスマッチを含んでいてもよい。例えば、標的配列とｇＲＮＡの

ガイド配列は、１、２、３、または４個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約２０である。いくつかの実施形態では、標的配列とｇＲＮＡのガイド配列は、１～４個のミスマッチを含んでいてもよく、ここで、ガイド配列は、２０個のヌクレオチドである。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、本明細書に記載のＣａｓ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（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼをコードするオルソログを含むｍＲＮＡが提供されるか、使用されるか、または投与される。

【０４２９】

Ｂ．修飾ｇＲＮＡおよびｍＲＮＡ

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、化学修飾されている。１つ以上の修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドを含むｇＲＮＡは、標準的なＡ、Ｇ、Ｃ、およびＵ残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される１つ以上の非天然および／または天然に存在する成分または構造の存在を記載するために、「修飾」ｇＲＮＡまたは「化学修飾」ｇＲＮＡと呼ばれる。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、非標準的なヌクレオシドまたはヌクレオチドを用いて合成され、本明細書では「修飾された」と呼ばれる。修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドは、（ｉ）ホスホジエステル骨格結合における改変、例えば、非架橋のリン酸酸素の１つもしくは両方、および／または、架橋リン酸酸素の１つ以上の置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｉ）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の２’ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（ｉｉｉ）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（ｉｖ）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、（ｖ）リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、（ｖｉ）オリゴヌクレオチドの３’末端または５’末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾もしくは置き換え、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション（そのような３’または５’のキャップ修飾は、糖および／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに（ｖｉｉ）糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の１つ以上を含み得る。

【０４３０】

上に列挙されるもの等の化学修飾を組み合わせて、２、３、４、またはそれ以上の修飾を有し得るヌクレオシドおよびヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾ｇＲＮＡおよび／またはｍＲＮＡを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖および修飾核酸塩基を有し得る。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの各々の塩基は修飾され、例えば、全ての塩基がホスホロチオエート等の修飾リン酸基を有する。特定の実施形態では、ｇＲＮＡ分子のリン酸基の全て、または実質的に全てがホスホロチオエート基によって置き換えられる。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ＲＮＡの５’末端において、またはその近傍において少なくとも１つの修飾残基を含む。いくつかの実施形態では、修飾ｇＲＮＡは、ＲＮＡの３’末端において、またはその近傍において少なくとも１つの修飾残基を含む。

【０４３１】

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

【０４３２】

非修飾核酸は、例えば、細胞内ヌクレアーゼまたは血清中にみられるものによる分解を

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

【０４３３】

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

【０４３４】

修飾リン酸基の例は、ホスホロチオエート、ホスホロセレネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリールホスホネート、およびホスホトリエステルを含む。非修飾リン酸基中のリン酸原子は、アキラルである。しかしながら、非架橋酸素のうちの１つの、上述の原子または原子群のうちの１つによる置き換えは、リン原子をキラルにすることができる。立体リン原子は、「Ｒ」配置（本明細書においてＲｐ）または「Ｓ」配置（本明細書においてＳｐ）のいずれかを有し得る。骨格は、架橋酸素（すなわち、リン酸をヌクレオシドに連結する酸素）の、窒素（架橋ホスホロアミデート）、硫黄（架橋ホスホロチオエート）、および炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによってもまた修飾できる。置き換えは、いずれかの架橋酸素または両方の架橋酸素において生じ得る。

【０４３５】

リン酸基は、ある骨格修飾において、非リン含有連結基によって置き換えることができる。いくつかの実施形態では、帯電したリン酸基は、中性部分によって置き換えることができる。リン酸基を置き換えることのできる部分の例は、非限定的に、例えば、メチルホスホン酸、ヒドロキシルアミノ、シロキサン、カーボネート、カルボキシメチル、カルバメート、アミド、チオエーテル、エチレンオキシドリンカー、スフホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンジメチルヒドラゾ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉｍｅｔｈｙｌｈｙｄｒａｚｏ）、メチレンオキシメチルイミノ（ｍｅｔｈｙｌｅｎｅｏｘｙｍｅｔｈｙｌｉｍｉｎｏ）を含み得る。

【０４３６】

リン酸リンカーおよびリボース糖が、ヌクレアーゼ耐性ヌクレオシドまたはヌクレオチドの代替物によって置き換えられている核酸を模倣できるスキャフォールドもまた構築できる。そのような修飾は、骨格および糖修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸塩基は、代替骨格によって係留され得る。例は、非限定的に、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、およびペプチド核酸（ＰＮＡ）核酸塩基代替物を含み得る。

【０４３７】

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

【０４３８】

２’ヒドロキシル基修飾の例は、アルコキシまたはアリールオキシ（ＯＲ、式中「Ｒ」がアルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、Ｏ（CH_2CH_2O）$_n$$CH_2CH_2OR$であって式中Ｒが、例えば、Ｈまたは任意選択で置換されたアルキルであり、ｎが０～２０の整数であり得るもの（例えば、０～４、０～８、０～１０、０～１６、１～４、１～８、１～１０、１～１６、１～２０、２～４、２～８、２～１０、２～１６、２～２０、４～８、４～１０、４～１６、および４～２０）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅであり得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’－ヒドロキシル基をフッ素で置き換える２’－フルオロ修飾であり得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、２’ヒドロキシルが、例えばC_{1-6}アルキレンまたはC_{1-6}ヘテロアルキレン架橋を介して同一のリボース糖の４’炭素へと接続し得る「ロックド」核酸（ＬＮＡ）を含んでいてもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、Ｏ－アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、およびアミノアルコキシ、Ｏ（CH_2）$_n$－アミノ（ここで、アミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、もしくはジヘテロアリールアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は、リボース環がＣ２’－Ｃ３’結合を欠失している「アンロックド（ｕｎｌｏｃｋｅｄ）」核酸（ＵＮＡ）を含み得る。いくつかの実施形態では、２’ヒドロキシル基修飾は，メトキシエチル基（ＭＯＥ）、（$OCH_2CH_2OCH_3$、例えばＰＥＧ誘導体）を含み得る。

【０４３９】

「デオキシ」２’修飾は、水素（すなわち、デオキシリボース糖、例えば、部分的なｄｓＲＮＡの突出部分）、ハロ（例えば、ブロモ、クロロ、フルオロ、またはヨード）、アミノ（ここでアミノは、例えば、NH_2、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリールアミノ、ジアリールアミノ、ヘテロアリールアミノ、ジヘテロアリールアミノ、またはアミノ酸であり得る）、NH（CH_2CH_2NH）$_n$$CH2CH_2$－アミノ（ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである）、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｒ（ここでＲは、例えば、アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、または糖であり得る）、シアノ、メルカプト、アルキル－チオ－アルキル、チオアルコキシ、ならびにアルキル、シクロアルキル、アリール、アルケニルおよびアルキニルを含み得、任意選択で、例えば本明細書において記載されるようなアミノによって置換されていてもよい。

【０４４０】

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

【０４４１】

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

【０４４２】
デュアルガイドＲＮＡを用いる実施形態において、ｃｒＲＮＡとｔｒａｃｒＲＮＡの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、ｃｒＲＮＡおよび／またはｔｒａｃｒＲＮＡの一方または両方の末端に存在してもよい。ｓｇＲＮＡを含む実施形態では、ｓｇＲＮＡの一方または両方の末端における１つ以上の残基は、化学修飾されていてもよく、および／または内部ヌクレオシドが修飾されていてもよく、および／またはｓｇＲＮＡ全体が化学修飾されていてもよい。特定の実施形態は、５’末端修飾を含む。特定の実施形態は、３’末端修飾を含む。
【０４４３】
いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、ＷＯ２０１８／１０７０２８およびＷＯ２０１９／２３７０６９に開示された修飾パターンの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、本明細書に開示されるガイドＲＮＡは、請求項１～１５に記載される短いガイド構造、および／またはＷＯ２０１９／２３７０６９の請求項１６～４６２に記載される修飾パターンを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、ＷＯ２０１５／２００５５５に開示された構造／修飾パターンの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本明細書において開示されるガイドＲＮＡは、ＷＯ２０１７／１３６７９４に開示された構造／修飾パターンの１つを含み、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０４４４】
Ｃ．ＹＡ修飾
ＹＡ部位における修飾（本明細書でＹＡ修飾とも称される）は、ヌクレオシド間連結の修飾、例えば、化学修飾、置換、または他の方法による、塩基（ピリミジンまたはアデニン）の修飾、および／または糖の修飾（例えば、２位での修飾、例えば、２’－Ｏ－アルキル、２’－Ｆ、２’－ｍｏｅ、２’－Ｆアラビノース、２’－Ｈ（デオキシリボース）等）であり得る。いくつかの実施形態では、「ＹＡ修飾」は、例えば、ＲＮａｓｅによるＹＡ部位の認識もしくは切断を妨げることによって、および／またはＲＮａｓｅへの切断部位のアクセスを低減するＲＮＡ構造（例えば、二次構造）を安定化させることによって、ＲＮＡエンドヌクレアーゼ活性を低減するためにジヌクレオチドモチーフの構造を変化させる任意の修飾である。Ｐｅａｃｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｏｒｇ Ｃｈｅｍ．７６：７２９５－７３００（２０１１）、Ｂｅｈｌｋｅ、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ １８：３０５－３２０（２００８）、Ｋｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ １０４：１６－２８（２０１６）、Ｇｈｉｄｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２０１３、４９、９０３６を参照のこと。Ｐｅａｃｏｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｅｌｈｋｅ，ＫｕおよびＧｈｉｄｉｎｉは、ＹＡ修飾として好適な例示的な修飾を提供する。エンドヌクレオチド分解を低減するための当業者に既知の修飾が包含される。ＲＮａｓｅ切断に関与する２’ヒドロキシル基に影響を与える例示的な２’リボース修飾は、２’－Ｈおよび２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－Ｍｅを含む）である。ＹＡ部位における残基の二環式リボースアナログＵＮＡ、および修飾ヌクレオシド間連結等の修飾は、ＹＡ修飾であり得る。ＲＮＡ構造を安定化させることができる例示的な塩基修飾は、プソイドウリジンおよび５－メチルシトシンである。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のうちの少なくとも１個のヌクレオチドが修飾されている。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジン（「ピリミジン位置」とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾、ピリミジン塩基の修飾、およびリボースの、例えばその２’位での修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のアデニン（「アデニン位置」とも称される）は、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾、ピリミジン塩基の修飾、およびリボースの、例えばその２’位での修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジンおよびアデニンは、修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ＲＮＡエンドヌクレアーゼ活性を低下させる。

【０４４５】
いくつかの実施形態では、短いｓｇＲＮＡは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、またはそれ以上のＹＡ部位における修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジンは、修飾（ピリミジンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のアデニンは修飾（アデニンの糖の直ぐ３’側のヌクレオシド間連結を変化させる修飾を含む）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位のピリミジンおよびアデニンは、糖、塩基、またはヌクレオシド間連結の修飾等の修飾を含む。ＹＡ修飾は、本明細書に記載されるいずれかの種類の修飾であり得る。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ホスホロチオエート、２’－ＯＭｅ、または２’－フルオロのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ホスホロチオエート、２’－ＯＭｅ、または２’－フルオロのうちの１つ以上を含むピリミジン修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、１つ以上のＹＡ部位を含むＲＮＡ二本鎖領域内の二環式リボースアナログ（例えばＬＮＡ、ＢＮＡ、またはＥＮＡ）を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ＹＡ部位を含むＲＮＡ二本鎖領域内の二環式リボースアナログ（例えば、ＬＮＡ、ＢＮＡ、またはＥＮＡ）を含み、ＹＡ修飾は、ＹＡ部位に対して遠位にある。

【０４４６】
いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、ガイド領域のＹＡ部位修飾を含む。いくつかの実施形態では、ガイド領域は、ＹＡ修飾を含み得る、１、２、３、４、５個またはそれ以上のＹＡ部位（「ガイド領域ＹＡ部位」）を含む。いくつかの実施形態では、５’末端部の５’末端から５末端、６末端、７末端、８末端、９末端、または１０末端に位置する１つ以上のＹＡ部位（「５末端」等は、ガイド領域の３’末端に対して５位、すなわち、ガイド領域内の最も３’のヌクレオチドを指す）は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端部の５’末端から５末端、６末端、７末端、８末端、９末端、または１０末端に位置する２つ以上のＹＡ部位が、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端部の５’末端から５末端、６末端、７末端、８末端、９末端、または１０末端に位置する３つ以上のＹＡ部位が、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端部の５’末端から５末端、６末端、７末端、８末端、９末端、または１０末端に位置する４つ以上のＹＡ部位が、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、５’末端部の５’末端から５末端、６末端、７末端、８末端、９末端、または１０末端に位置する５つ以上のＹＡ部位が、ＹＡ修飾を含む。修飾ガイド領域ＹＡ部位は、ＹＡ修飾を含む。

【０４４７】
いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、ガイド領域の３’末端部ヌクレオチドの１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、または９個のヌクレオチド内にある。例えば、修飾ガイド領域ＹＡ部位が、ガイド領域の３’末端部ヌクレオチドの１０個のヌクレオチド内にあり、ガイド領域が、２０個のヌクレオチド長である場合、修飾ガイド領域ＹＡ部位の修飾ヌクレオチドは、１１～２０位のいずれかに位置する。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ガイド領域の３’末端部ヌクレオチドからＹＡ部位の２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１個のヌクレオチド内に位置する。いくつかの実施形態では、ＹＡ修飾は、ガイド領域の３’末端部ヌクレオチドから２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、または１個のヌクレオチドに位置する。

【０４４８】
いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、５’末端部の５’末端からのヌクレオチド４、５、６、７、８、９、１０、または１１番目、またはその後である。

【０４４９】
いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、５’末端修飾以外である。例えば、ｓｇＲＮＡは、本明細書に記載の５’末端修飾を含んでいてもよく、修飾ガイド領域ＹＡ部位をさらに含んでいてもよい。あるいは、ｓｇＲＮＡは、非修飾５’末端と、修飾

ガイド領域ＹＡ部位と、を含むことができる。あるいは、ｓｇＲＮＡは、修飾５’末端と、非修飾ガイド領域ＹＡ部位と、を含むことができる。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、ガイド領域ＹＡ部位の５’側に位置する少なくとも１個のヌクレオチドを含まない修飾を含む。例えば、ヌクレオチド１～３がホスホロチオエートを含み、ヌクレオチド４が２’－ＯＭｅ修飾のみを含み、ヌクレオチド５がＹＡ部位のピリミジンであり、ホスホロチオエートを含む場合、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、ガイド領域ＹＡ部位（ヌクレオチド４）の５’に位置する少なくとも１個のヌクレオチドを含まない修飾（ホスホロチオエート）を含む。別の例では、ヌクレオチド１～３がホスホロチオエートを含み、ヌクレオチド４がＹＡ部位のピリミジンであり、２’－ＯＭｅを含む場合、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、ガイド領域ＹＡ部位の５’に位置する少なくとも１個のヌクレオチド（ヌクレオチド１～３のいずれか）を含まない修飾（２’－ＯＭｅ）を含む。この条件はまた、非修飾ヌクレオチドが修飾ガイド領域ＹＡ部位の５’に位置する場合には、常に満たされる。

【０４５１】

いくつかの実施形態では、修飾ガイド領域ＹＡ部位は、上のＹＡ部位について記載される修飾を含む。

【０４５２】

ガイド領域ＹＡ部位修飾の追加の実施形態は、上記の概要に示される。本開示の他の箇所に記載される任意の実施形態は、実現可能な範囲で、先行実施形態のいずれかと組み合わせ得る。

【０４５３】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、保存領域ＹＡ部位修飾を含む。保存領域ＹＡ部位１～１０を図１４に示す。いくつかの実施形態では、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の保存領域ＹＡ部位は、修飾を含む。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、保存領域ＹＡ部位１、８、または１および８は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、保存領域ＹＡ部位１、２、３、４、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位２、３、４、８、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、保存領域ＹＡ部位１、２、３、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位２、３、８、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、ＹＡ部位１、２、３、４、８、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、１、２、３、４、５、６、７、または８つの追加の保存領域ＹＡ部位は、ＹＡ修飾を含む。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、１、２、３、または４つの保存領域ＹＡ部位２、３、４、および１０は、ＹＡ修飾を含む。いくつかの実施形態では、１、２、３、４、５、６、７、または８つの追加の保存領域ＹＡ部位は、ＹＡ修飾を含む。

【０４５６】

いくつかの実施形態では、修飾保存領域ＹＡ部位は、上記ＹＡ部位について記載される修飾を含む。

【０４５７】

保存領域ＹＡ部位修飾のさらなる実施形態は、上記の概要に示される。本開示の他の箇所に記載される任意の実施形態は、実現可能な範囲で、先行実施形態のいずれかと組み合わせ得る。

【０４５８】

いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列と、表４に示されるｓｇＲＮＡの任意の保存部分とを含み、任意選択で、表４に示されるｓｇＲＮＡのいずれかの修飾パターンを有し、任意選択で、ｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾（表４の構築物に既に示されていない場合）を含む、ｓｇＲＮＡが提供さ

れる。

【０４５９】

いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、以下の表４に示される修飾パターンのいずれかを含み、ここで、Ｎは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎの全体は、表１で本明細書に記載されるＫＬＫＢ１ガイド配列を含む。表４は、ｓｇＲＮＡのガイド配列部分を示していない。修飾は、ガイドのヌクレオチドに対するＮの置換にもかかわらず、表４に示されるように残っている。すなわち、ガイドのヌクレオチドは「Ｎ」を置き換えるが、表４に示されるようにヌクレオチドが修飾される。

【表１２】

表４：ｓｇＲＮＡ修飾パターンおよびｓｇＲＮＡの保存部分。ガイド配列は示されず、その５’末端に、示される配列を付加する。

配列番号	名称	配列
171	例示的な保存部分	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
172	例示的な保存部分	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC
173	例示的な保存部分	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
170	例示的な保存部分	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
168	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
169	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
400	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
401	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
402	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
403	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
404	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
405	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

406	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
407	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
408	例示的な-修飾のみ	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
409	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
410	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
411	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
412	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
413	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
414	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

415	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
416	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
417	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
418	例示的な-修飾のみ	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
419	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
420	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
421	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
422	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
423	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
424	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU

425	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
426	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
427	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
428	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
429	例示的な-修飾のみ	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
430	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
431	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
432	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
433	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU*mU
434	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU*mU

435	例示的な-修飾のみ	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
436	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
437	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
438	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
439	例示的な-修飾のみ	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
440	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
441	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
442	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
443	例示的な-修飾のみ	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
444	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU

445	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
446	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
447	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
448	例示的な-ガイド領域修飾のみ	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNNfNfNNN
449	例示的な-ガイド領域修飾のみ	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNN
450	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
174	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUAAGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
175	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUCAGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
176	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCCACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
177	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUACGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
178	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGAGCUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
179	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
180	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
181	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

182	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAGUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
183	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACAGUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
184	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
185	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
186	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
187	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
188	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
189	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
190	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGCAAAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
191	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
192	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGU*mG*mC*mU
193	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
194	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCCGAAAGGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
195	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
196	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
197	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
198	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
199	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

202	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
203	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
204	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
205	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
206	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
207	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
208	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
209	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
210	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCG*mG*mU*mG
211	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUC*mG*mG*mU
212	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGU*mC*mG*mG
213	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAG*mU*mC*mG
214	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGA*mG*mU*mC
215	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCG*mA*mG*mU
216	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
217	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
218	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
219	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

220	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
221	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGGAAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
222	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
223	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAGCUAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
224	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
225	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
226	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
227	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGUAUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
228	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGUUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
229	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGAUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
230	例示的な-修飾のみ	GUUUUCGAGCUAGAAAUAGCAAGUGAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
231	例示的な-修飾のみ	GUUUUUGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
232	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAGAAAUCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
233	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCGAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
234	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCCGGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
235	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUGAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
236	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUGGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
237	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUCGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

238	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUUGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
239	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUGUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
240	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUCUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
241	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUUUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
242	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUGAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
243	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGGACCGAGUCGG*mU*mC*mC
244	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGAACCGAGUCGG*mU*mU*mC
245	例示的な-修飾のみ	GUUUUCGAGCGAGAAAUCGCGAGUGAAAAUGAGGCUGGUCCGUUGUGAACUUGGAACCGAGUCGG*mU*mU*mC
246	例示的な-修飾のみ	GUUUUUGAGCGAGAAAUCGCAAGUAAAAAUAAGGCUCGUCCGUUCUGAACUUGGAACCGAGUCGG*mU*mU*mC
247	例示的な-修飾のみ	GUUUCGGAGCCGGAAACGGCGAGUCGAAAUGAGGCUGGUCCGUUGUCGGCUCGGAACCGAGUCGG*mU*mU*mC
248	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
249	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
250	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
251	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
252	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
253	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
254	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
255	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

256	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
257	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
258	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
259	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
260	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
261	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
262	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA AAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
263	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAGCAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA AAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
264	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
265	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAAGAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
266	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmCmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmG*mU*mG*mC
267	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmG*mU*mG*mC
268	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCACmGmAmAmAmGmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmG*mU*mG*mC
269	例示的な-修飾のみ	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAAmAmAmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmG*mU*mG*mC

【０４６０】

いくつかの実施形態では、修飾ｓｇＲＮＡは、以下の配列ｍＮ＊ｍＮ＊ｍＮ＊ＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＮＧＵＵＵＵＡＧＡｍＧｍＣｍＵｍＡｍＧｍＡｍＡｍＡｍＵｍＡｍＧｍＣＡＡＧＵＵＡＡＡＡＵＡＡＧＧＣＵＡＧＵＣＣＧＵＵＡＵＣＡｍＡｍＣｍＵｍＵｍＧｍＡｍＡｍＡｍＡｍＡｍＧｍＵｍＧｍＧｍＣｍＡｍＣｍＣｍＧｍＡｍＧｍＵｍＣｍＧｍＧｍＵｍＧｍＣｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ＊ｍＵ（配列番号３００）を含み、ここで、「Ｎ」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよく、Ｎの全体は、表１に記載されるＫＬＫＢ１ガイド配列を含む。例えば、本明細書に包含されるのは、配列番号３００であり、ここで、Ｎは、表１において本明細書で開示されるガイド配列（配列番号１～１４

９）のいずれかに置き換えられる。また、本明細書には、表１のガイド配列（配列番号１～１４９）のうちのいずれかを、ｓｇＲＮＡの保存部分、例えば、表４の配列と組み合わせたガイドＲＮＡも包含される。

【０４６１】

以下に記載される修飾のいずれも、本明細書に記載されるｇＲＮＡおよびｍＲＮＡ内に存在し得る。

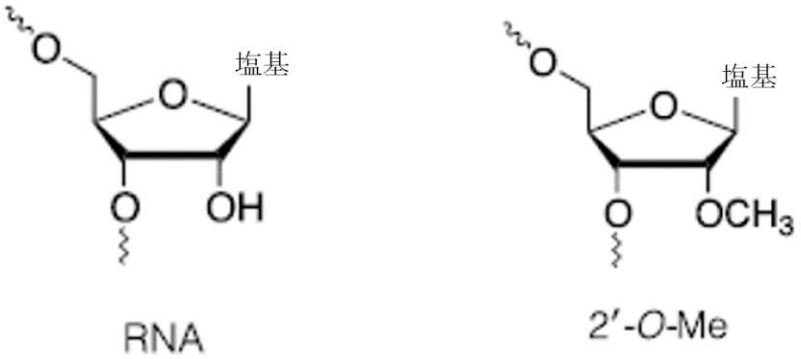
【０４６２】

「ｍＡ」、「ｍＣ」、「ｍＵ」、または「ｍＧ」という用語は、２’－Ｏ－Ｍｅで修飾されたヌクレオチドを表すために使用され得る。

【０４６３】

２’－Ｏ－メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

【化１】



【０４６４】

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

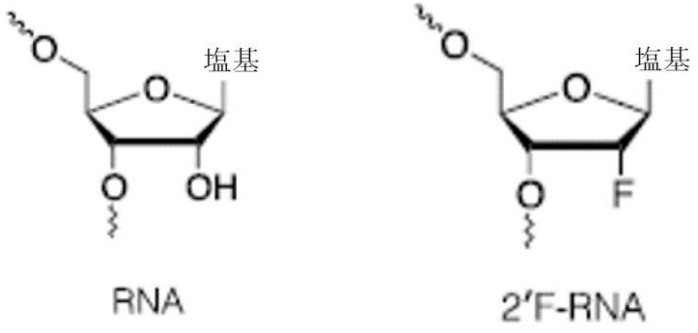
【０４６５】

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

【０４６６】

２’－Ｆの置換は、以下のように描写され得る。

【化２】

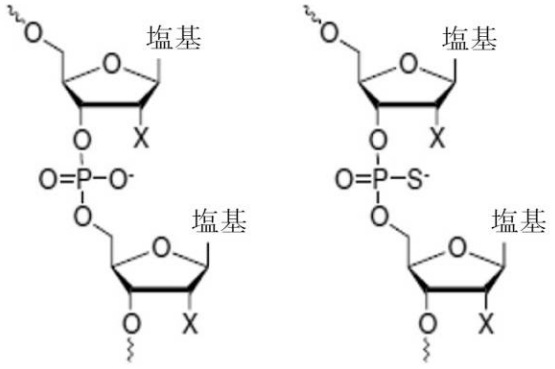


RNA の天然組成物　　2'F 置換

【０４６７】

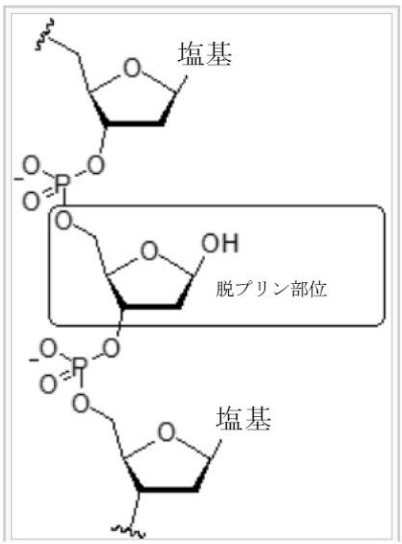
ホスホロチオエート（ＰＳ）連結または結合とは、ホスホジエステル連結、例えばヌクレオチド塩基間の結合での１個の非架橋リン酸酸素を硫黄が置換する結合を指す。ホスホロチオエートを使用してオリゴヌクレオチドを生成する場合、修飾オリゴヌクレオチドはＳ－オリゴとも称され得る。

【０４６８】
ＰＳ修飾を示すために、「＊」を使用し得る。本出願では、用語Ａ＊、Ｃ＊、Ｕ＊、またはＧ＊を使用して、ＰＳ結合で隣の（例えば３’）ヌクレオチドに結合されているヌクレオチドを示すことができる。
【０４６９】
本出願では、「ｍＡ＊」、「ｍＣ＊」、「ｍＵ＊」、または「ｍＧ＊」という用語を使用して、２’－Ｏ－Ｍｅで置換され、ＰＳ結合で次の（例えば３’）ヌクレオチドに連結されているヌクレオチドを示すことができる。
【０４７０】
以下の図は、非架橋リン酸酸素へのＳ－の置換を示し、ホスホジエステル結合の代わりにＰＳ結合を生じる。
【化３】



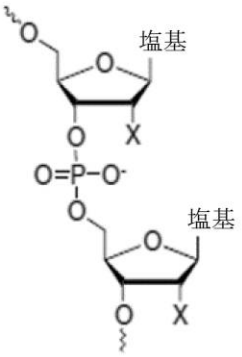
ＲＮＡの天然ホスホジエステル連結
修飾ホスホロチオエート(PS）結合

【０４７１】
脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠いているものを指す。以下の図は、塩基を欠く脱塩基（脱プリンとしても知られる）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する。
【化４】

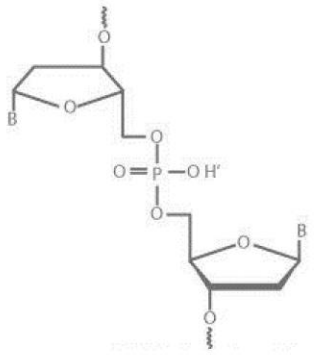


【０４７２】
反転した塩基は、通常の５’から３’への連結とは反転した連結を有するものを指す（すなわち、５’から５’への連結または３’から３’への連結のいずれか）。例えば、

【化５】



標準のオリゴヌクレオチド連結



反転オリゴヌクレオチド連結

【０４７３】
脱塩基ヌクレオチドは、反転した連結と接続することができる。例えば、脱塩基ヌクレオチドは、５’から５’結合を介して末端５’ヌクレオチドに結合してもよいし、または脱塩基ヌクレオチドは、３’から３’結合を介して末端３’ヌクレオチドに結合してもよい。末端５’または３’ヌクレオチドのいずれかにおける反転した脱塩基ヌクレオチドはまた、反転した脱塩基末端キャップと称され得る。

【０４７４】
いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３、４、または５個のヌクレオチドのうちの１つ以上、および３’末端部における最後の３、４、または５個のヌクレオチドのうちの１つ以上が修飾されている。いくつかの実施形態では、修飾は、２’－Ｏ－Ｍｅ、２’－Ｆ、反転した脱塩基ヌクレオチド、ＰＳ結合、または安定性および／または性能を増加させることが当該技術分野において周知の他のヌクレオチド修飾である。

【０４７５】
いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の４個のヌクレオチド、および３’末端部における最後の４個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート（ＰＳ）結合を用いて連結される。

【０４７６】
いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、および３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－Ｏ－メチル（２’－Ｏ－Ｍｅ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、および３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、２’－フルオロ（２’－Ｆ）修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、５’末端部における最初の３個のヌクレオチド、および３’末端部における最後の３個のヌクレオチドは、反転した脱塩基ヌクレオチドを含む。

【０４７７】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、修飾ｓｇＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、表４に示されるｓｇＲＮＡの任意の保存部分を含み、任意選択で、表４に示されるｓｇＲＮＡのいずれかの修飾パターンを有し、任意選択で、ｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾（表４の構築物に既に示されていない場合）を含むものが提供される。いくつかの実施形態では、ｓｇＲＮＡは、表４に示されるｓｇＲＮＡのいずれかの修飾パターンを含み、Ｎは、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり、Ｎの全体は、ＫＬＫＢ１内の標的配列に対してヌクレアーゼを指向させるガイド配列（例えば、表１に示されるようなもの）を含む。

【０４７８】
いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列と、表４に示されるｓｇＲＮＡの任意の保存部分とを含むｓｇＲＮＡを含み

、任意選択で、表４に示されるｓｇＲＮＡのいずれかの修飾パターンを有し、任意選択で、ｓｇＲＮＡが、５’末端修飾および３’末端修飾（表４の構築物に既に示されていない場合）を含む。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡは、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つのガイド配列と、配列番号１７０、１７１、１７２または１７３のヌクレオチドとを含むｓｇＲＮＡを含み、配列番号１７０、１７１、１７２または１７３のヌクレオチドが、ガイド配列の３’末端上にあり、ｓｇＲＮＡは、表４または配列番号３００に示されるように修飾され得る。

【０４７９】

上述のように、いくつかの実施形態では、本明細書に開示の組成物または製剤は、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、本明細書に記載のＣａｓ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（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓ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（ＯＲＦ）を含むｍＲＮＡが提供されるか、使用されるか、または投与される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼをコードするＯＲＦは、「修飾ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤ＯＲＦ」または単に「修飾ＯＲＦ」であり、ＯＲＦが修飾されていることを示すための略語として使用される。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、修飾ＯＲＦは、少なくとも１つ、複数、または全てのウリジン位置に、修飾ウリジンを含み得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、５位で修飾されたウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、例えば、ハロゲン、メチル、またはエチルで、１位で修飾されたプソイドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、プソイドウリジン、Ｎ１－メチル－プソイドウリジン、５－メトキシウリジン、５－ヨードウリジン、またはそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－メトキシウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチル－プソイドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、Ｎ１－メチルプソイドウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンとＮ１－メチル－プソイドウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、プソイドウリジンと５－ヨードウリジンの組み合わせである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、５－ヨードウリジンと５－メトキシウリジンの組み合わせである。

【０４８１】

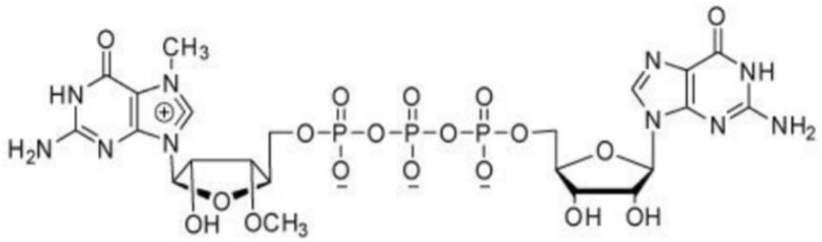
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｍＲＮＡは、５’キャップ、例えば、Ｃａｐ０、Ｃａｐ１、またはＣａｐ２を含む。５’キャップは、一般に、ｍＲＮＡの５’－３’鎖の第１のヌクレオチド（すなわち、第１のキャップ近位のヌクレオチド）の５’位に対して５’－トリホスフェートを介して連結した７－メチルグアニンリボヌクレオチド（例えば、ＡＲＣＡに関して、以下に考察されるようにさらに修飾されてもよい）である。Ｃａｐ０において、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－ヒドロキシルを含む。Ｃａｐ１において、ｍＲＮＡの第１および第２の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、２’－メトキシおよび２’－ヒドロキシを含む。Ｃａｐ２において、ｍＲＮＡの第１および第２のキャップ近位のヌクレオチドのリボースは、両方とも、２’－メトキシを含む。例えば、Ｋａｔｉｂａｈ ｅｔ ａｌ．（２０１４）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１１（３３）：１２０２５－３０、Ａｂｂａｓ ｅｔ ａｌ．（２０１７）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １１４（１１）：Ｅ２１０６－Ｅ２１１５を参照のこと。ヒトｍＲＮＡ等の哺乳動物ｍＲＮＡを含む、ほとんどの内因性の高級真核生物ｍＲＮＡは、Ｃａｐ１または

Ｃａｐ２を含む。Ｃａｐ０、およびＣａｐ１およびＣａｐ２とは異なる他のキャップ構造は、ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５等の自然免疫系の構成要素によって「非自己」として認識されるため、ヒト等の哺乳動物において免疫原性である場合があり、Ｉ型インターフェロンを含むサイトカインレベルの上昇を引き起こし得る。ＩＦＩＴ－１およびＩＦＩＴ－５等の自然免疫系の構成要素はまた、Ｃａｐ１またはＣａｐ２以外のキャップとのｍＲＮＡの結合についてｅＩＦ４Ｅと競合する場合があり、ｍＲＮＡの翻訳を潜在的に阻害する。

【０４８２】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ＡＲＣＡ（抗逆キャップ類似体、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号ＡＭ８０４５）は、グアニンリボヌクレオチドの５’位に連結する７－メチルグアニン３’－メトキシ－５’－トリホスフェートを含むキャップ類似体であり、開始時にインビトロで転写産物に組み込むことができる。ＡＲＣＡは、第１のキャップ近位のヌクレオチドの２’位がヒドロキシルであるＣａｐ０キャップをもたらす。例えば、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，（２００１）“Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ｍＲＮＡｓ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｔｈｅ ｎｏｖｅｌ ‘ａｎｔｉ－ｒｅｖｅｒｓｅ’ｃａｐ ａｎａｌｏｇｓ ７－ｍｅｔｈｙｌ（３’－Ｏ－ｍｅｔｈｙｌ）ＧｐｐｐＧ ａｎｄ ７－ｍｅｔｈｙｌ（３’ｄｅｏｘｙ）ＧｐｐｐＧ，”ＲＮＡ ７：１４８６－１４９５を参照のこと。ＡＲＣＡの構造を以下に示す。

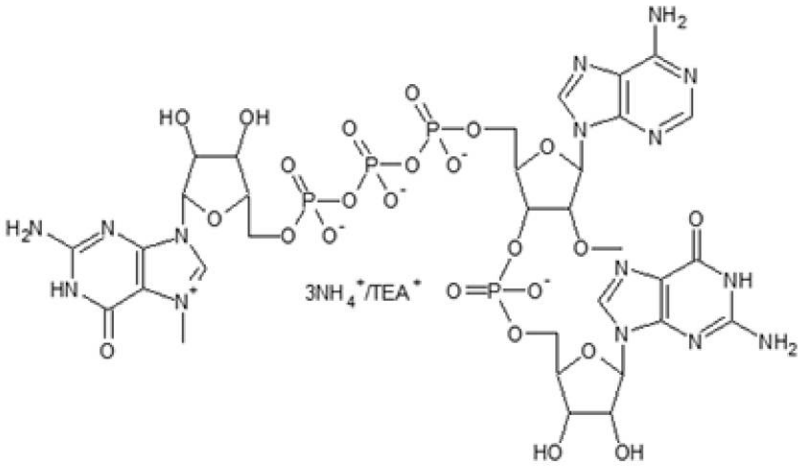
【化６】



【０４８３】

ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＡ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１１３）またはＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧ（ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）（２’ＯＭｅＧ）ｐＧ、ＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓカタログ番号Ｎ－７１３３）を使用して、Ｃａｐ１構造を共転写的に提供することができる。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧおよびＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＧＧの３’－Ｏ－メチル化態様も、それぞれ、カタログ番号Ｎ－７４１３およびＮ－７４３３としてＴｒｉＬｉｎｋ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓから入手可能である。ＣｌｅａｎＣａｐ（商標）ＡＧの構造を以下に示す。

【化７】



【０４８４】

あるいは、転写後に、キャップをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｖａｃｃｉｎｉａキャッピング酵素は市販されており（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓカタログ番号Ｍ２０８０Ｓ）、そのＤ１サブユニットによって与えられるＲＮＡトリホスファターゼおよびグアニリルトランスフェラーゼ活性と、そのＤ１２サブユニットによって与えられるグアニンメチルトランスフェラーゼを有する。したがって、Ｓ－アデノシルメチオニンおよびＧＴＰの存在下で、Ｃａｐ０を与えるように、７－メチルグアニンをＲＮＡに付加することができる。例えば、Ｇｕｏ，Ｐ．ａｎｄ　Ｍｏｓｓ，Ｂ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７，４０２３－４０２７、Ｍａｏ，Ｘ．ａｎｄ　Ｓｈｕｍａｎ，Ｓ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６９、２４４７２－２４４７９を参照のこと。

【０４８５】

いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ポリアデニル化（ポリ－Ａ）テールをさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、少なくとも２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００個のアデニンを含み、任意選択で、３００個までのアデニンを含む。いくつかの実施形態では、ポリ－Ａテールは、９５、９６、９７、９８、９９、または１００個のアデニンヌクレオチドを含む。

【０４８６】

Ｄ．リボ核タンパク質複合体

いくつかの実施形態では、本開示は、表１または２からの１つ以上のガイド配列を含む１つ以上のｇＲＮＡと、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、ヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９と、を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリバーゼ活性を有し、これは二本鎖エンドヌクレアーゼ活性とも称され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓヌクレアーゼを含む。Ｃａｓ９ヌクレアーゼの例としては、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、および他の原核生物のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のもの（例えば、次の段落のリストを参照のこと）、ならびにそれらの修飾（例えば、操作型または変異体）態様が挙げられる。例えば、ＵＳ２０１６／０３１２１９８Ａ１、ＵＳ２０１６／０３１２１９９Ａ１を参照のこと。Ｃａｓヌクレアーゼの他の例としては、ＩＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のＣｓｍまたはＣｍｒ複合体、またはＣａｓ１０、Ｃｓｍ１、もしくはそのＣｍｒ２サブユニット、およびＩ型ＣＲＩＳＰＲ系のカスケード複合体、またはそのＣａｓ３サブユニットが挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩＡ型、ＩＩＢ型、またはＩＩＣ型の系に由来していてもよい。様々なＣＲＩＳＰＲ系およびＣａｓヌクレアーゼの考察については、例えば、Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，ＮＡＴ．ＲＥＶ．ＭＩＣＲＯＢＩＯＬ．９：４６７－４７７（２０１１）、Ｍａｋａｒｏｖａ　ｅｔ　ａ

ｌ．，ＮＡＴ．ＲＥＶ．ＭＩＣＲＯＢＩＯＬ，１３：７２２－３６（２０１５）、Ｓｈｍａｋｏｖ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＥＬＬ，６０：３８５－３９７（２０１５）を参照のこと。

【０４８７】

Ｃａｓヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｉｎｎｏｃｕａ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｇａｓｓｅｒｉ、Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ ｎｏｖｉｃｉｄａ、Ｗｏｌｉｎｅｌｌａ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ、Ｓｕｔｔｅｒｅｌｌａ ｗａｄｓｗｏｒｔｈｅｎｓｉｓ、Ｇａｍｍａｐｒｏｔｅｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｊｅｊｕｎｉ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ、Ｆｉｂｒｏｂａｃｔｅｒ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅ、Ｒｈｏｄｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｒｕｂｒｕｍ、Ｎｏｃａｒｄｉｏｐｓｉｓ ｄａｓｓｏｎｖｉｌｌｅｉ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｐｒｉｓｔｉｎａｅｓｐｉｒａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｖｉｒｉｄｏｃｈｒｏｍｏｇｅｎｅｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ｓｔｒｅｐｔｏｓｐｏｒａｎｇｉｕｍ ｒｏｓｅｕｍ、Ａｌｉｃｙｃｌｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｉｄｏｃａｌｄａｒｉｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｓｅｕｄｏｍｙｃｏｉｄｅｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｅｌｅｎｉｔｉｒｅｄｕｃｅｎｓ、Ｅｘｉｇｕｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｉｂｉｒｉｃｕｍ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｃｈｎｅｒｉ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、Ｍｉｃｒｏｓｃｉｌｌａ ｍａｒｉｎａ、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａｌｅｓ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｎａｐｈｔｈａｌｅｎｉｖｏｒａｎｓ、Ｐｏｌａｒｏｍｏｎａｓ ｓｐ．、Ｃｒｏｃｏｓｐｈａｅｒａ ｗａｔｓｏｎｉｉ、Ｃｙａｎｏｔｈｅｃｅ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｙｓｔｉｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ａｃｅｔｏｈａｌｏｂｉｕｍ ａｒａｂａｔｉｃｕｍ、Ａｍｍｏｎｉｆｅｘ ｄｅｇｅｎｓｉｉ、Ｃａｌｄｉｃｅｌｕｌｏｓｉｒｕｐｔｏｒ ｂｅｃｓｃｉｉ、Ｃａｎｄｉｄａｔｕｓ Ｄｅｓｕｌｆｏｒｕｄｉｓ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、Ｆｉｎｅｇｏｌｄｉａ ｍａｇｎａ、Ｎａｔｒａｎａｅｒｏｂｉｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、Ｐｅｌｏｔｏｍａｃｕｌｕｍ ｔｈｅｒｍｏｐｒｏｐｉｏｎｉｃｕｍ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｃａｌｄｕｓ、Ａｃｉｄｉｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｎｓ、Ａｌｌｏｃｈｒｏｍａｔｉｕｍ ｖｉｎｏｓｕｍ、Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｌｏｐｈｉｌｕｓ、Ｎｉｔｒｏｓｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｔｓｏｎｉ、Ｐｓｅｕｄｏａｌｔｅｒｏｍｏｎａｓ ｈａｌｏｐｌａｎｋｔｉｓ、Ｋｔｅｄｏｎｏｂａｃｔｅｒ ｒａｃｅｍｉｆｅｒ、Ｍｅｔｈａｎｏｈａｌｏｂｉｕｍ ｅｖｅｓｔｉｇａｔｕｍ、Ａｎａｂａｅｎａ ｖａｒｉａｂｉｌｉｓ、Ｎｏｄｕｌａｒｉａ ｓｐｕｍｉｇｅｎａ、Ｎｏｓｔｏｃ ｓｐ．、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｍａｘｉｍａ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ、Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｓｐ．、Ｌｙｎｇｂｙａ ｓｐ．、Ｍｉｃｒｏｃｏｌｅｕｓ ｃｈｔｈｏｎｏｐｌａｓｔｅｓ、Ｏｓｃｉｌｌａｔｏｒｉａ ｓｐ．、Ｐｅｔｒｏｔｏｇａ ｍｏｂｉｌｉｓ、Ｔｈｅｒｍｏｓｉｐｈｏ ａｆｒｉｃａｎｕｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐａｓｔｅｕｒｉａｎｕｓ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｃｉｎｅｒｅａ、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｌａｒｉ、Ｐａｒｖｉｂａｃｕｌｕｍ ｌａｖａｍｅｎｔｉｖｏｒａｎｓ、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ、Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．、Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ ｂａｃｔｅｒｉｕｍ ＮＤ２００６、およびＡｃａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａが挙げられる。

【０４８８】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙ

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

【０４８９】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤とともに含むｇＲＮＡは、リボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）と呼ばれる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼとともに含むｇＲＮＡは、Ｃａｓ ＲＮＰと呼ばれる。いくつかの実施形態では、ＲＮＰは、Ｉ型、ＩＩ型、またはＩＩＩ型の構成要素を含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系由来のＣａｓ９タンパク質である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９とともに含むｇＲＮＡは、Ｃａｓ９ ＲＮＰと呼ばれる。

【０４９０】

野生型Ｃａｓ９は、２つのヌクレアーゼドメイン、ＲｕｖＣおよびＨＮＨを有する。ＲｕｖＣドメインは、非標的ＤＮＡ鎖を切断し、ＨＮＨドメインは、ＤＮＡの標的鎖を切断する。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、１個より多いＲｕｖＣドメインおよび／または１個より多いＨＮＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９タンパク質は、野生型Ｃａｓ９である。組成物、使用および方法の実施形態の各々において、Ｃａｓは、標的ＤＮＡにおける二本鎖切断を誘導する。

【０４９１】

いくつかの実施形態では、キメラＣａｓヌクレアーゼが使用され、タンパク質の１つのドメインまたは領域が、異なるタンパク質の一部によって置き換えられている。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼドメインは、Ｆｏｋ１等の異なるヌクレアーゼ由来のドメインで置き換えられてもよい。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、修飾ヌクレアーゼであってもよい。

【０４９２】

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

【０４９３】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、一本鎖ニッカーゼ活性を有し、すなわち、１つのＤＮＡ鎖を切断して一本鎖切断（「ニック」としても知られる）を産生することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、Ｃａｓニッカーゼを含む。ニッカーゼは、ｄｓＤＮＡ内でニックを作製する酵素であり、すなわち、ＤＮＡ二重らせんの一方の鎖を切断するが、他方の鎖を切断しない。いくつかの実施形態では、Ｃａｓニッカーゼは、例えば、触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、エンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上で考察されるＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、Ｃａｓニッカーゼおよび例示的な触媒ドメイン改変の考察については、米国特許第８，８８９，３５６号を参照のこと。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９ニッカーゼ等のＣａｓニッカーゼは、不活性化されたＲｕｖＣまたはＨＮＨドメインを有する。

【０４９４】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個の機能的ヌクレアーゼドメインのみを含有するように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、その核酸切断活性を低減させるために、ヌクレアーゼドメインの１つが変異されるか、または完全もしくは部分的に欠失するように修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性が低減したＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なＲｕｖＣドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、活性が低減したＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。いくつかの実施形態では、不活性なＨＮＨドメインを有するニッカーゼが使用される。

【０４９５】

いくつかの実施形態では、Ｃａｓタンパク質ヌクレアーゼドメイン内の保存アミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低下させるか、または改変させるように置換される。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＲｕｖＣまたはＲｕｖＣ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ１０Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ　Ｃａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｃｅｌｌ　Ｏｃｔ　２２：１６３（３）：７５９－７７１を参照のこと。いくつかの実施形態では、Ｃａｓヌクレアーゼは、ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメイン内にアミノ酸置換を含み得る。ＨＮＨまたはＨＮＨ様ヌクレアーゼドメインにおける例示的なアミノ酸置換としては、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８６３Ａ、Ｈ９８３Ａ、およびＤ９８６Ａ（Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓのＣａｓ９タンパク質に基づく）が挙げられる。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅｅｔ　ａｌ．（２０１５）を参照のこと。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、Ｄ９１７Ａ、Ｅ１００６Ａ、およびＤ１２５５Ａ（Ｆｒａｎｃｉｓｅｌｌａ　ｎｏｖｉｃｉｄａ　Ｕ１１２　Ｃｐｆ１（ＦｎＣｐｆ１）配列（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ－Ａ０Ｑ７Ｑ２（ＣＰＦ１＿ＦＲＡＴＮ）に基づく）が挙げられる。

【０４９６】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼをコードするｍＲＮＡは、それぞれ、標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖に対して相補的な一対のガイドＲＮＡと組み合わせて提供される。この実施形態では、ガイドＲＮＡは、標的配列の反対側の鎖にニックを生成することによって（すなわち、ダブルニッキング）、ニッカーゼを標的配列に指向させ、ＤＳＢを導入する。いくつかの実施形態では、ダブルニッキングの使用は、特異性を改善し、オフターゲット効果を低減し得る。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ＤＮＡの反対側の鎖を標的とする２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内にダブルニックを産生する。いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、ごく接近した位置にあるように選択された２つの別個のガイドＲＮＡとともに使用され、標的ＤＮＡ内にダブルニックを産生する。

【０４９７】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、クリバーゼ活性およびニッカーゼ活性を欠いている。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ｄＣａ

ｓ　ＤＮＡ結合ポリペプチドを含む。ｄＣａｓポリペプチドは、触媒（クリバーゼ／ニッカーゼ）活性を本質的に欠く一方で、ＤＮＡ結合活性を有する。いくつかの実施形態では、ｄＣａｓポリペプチドは、ｄＣａｓ９ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、クリバーゼ活性およびニッカーゼ活性を欠くＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、またはｄＣａｓＤＮＡ結合ポリペプチドは、例えば、その触媒ドメイン内の１つ以上の改変（例えば、点変異）によって、そのエンドヌクレオチド分解活性部位が不活性化されたＣａｓヌクレアーゼ（例えば、上で考察されるＣａｓヌクレアーゼ）の一態様である。例えば、ＵＳ２０１４／０１８６９５８Ａ１、ＵＳ２０１５／０１６６９８０Ａ１を参照のこと。

【０４９８】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１つ以上の異種機能ドメインを含む（例えば、融合ポリペプチドであるか、または融合ポリペプチドを含む）。

【０４９９】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞核への輸送を促進し得る。例えば、異種機能ドメインは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）であり得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～１０個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１～５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個のＮＬＳと融合され得る。１個のＮＬＳが使用される場合、ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の配列のＮ末端部またはＣ末端部で連結され得る。これをＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の配列内に挿入することもできる。他の実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、１個より多いＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２、３、４、または５個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合され得る。特定の状況では、２個のＮＬＳは、同じ（例えば、２個のＳＶ４０　ＮＬＳ）であってもよく、または異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、カルボキシ末端部で連結された２個のＳＶ４０　ＮＬＳの配列に融合される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、２個のＮＬＳと融合していてもよく、１つはＮ末端部に連結しており、１つはＣ末端部に連結している。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、３個のＮＬＳと融合され得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ＮＬＳなしで融合され得る。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、例えば、ＳＶ４０　ＮＬＳ、ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号６００）またはＰＫＫＫＲＲＶ（配列番号６０１）等の単一部分配列であってもよい。いくつかの実施形態では、ＮＬＳは、ヌクレオプラズミンのＮＬＳ、ＫＲＰＡＡＴＫＫＡＧＱＡＫＫＫＫ（配列番号６０２）等の二部分配列であってもよい。特定の実施形態では、単一のＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号６００）ＮＬＳは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤のＣ末端部で連結され得る。１つ以上のリンカーは、任意選択で、融合部位に含まれる。

【０５００】

いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の細胞内半減期を修正することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が増加し得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の半減期が低減し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を増加させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤の安定性を低減させることができる。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、タンパク質分解のシグナルペプチドとして機能し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質分解は、例えば、プロテアソーム、リソソームプロテアーゼ、またはカルペインプロテアーゼ等のタンパク質分解酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＰＥＳＴ配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、ユビキチンまたはポリユビキチン鎖の付加によって修飾され得る。いくつかの実施形態では、ユビキチンは、ユビキチン様タンパク質（ＵＢＬ）であってもよい。ユビキチン様タンパク質の非限定的な例としては、小さなユビキチン様修

飾因子（ＳＵＭＯ）、ユビキチン交差反応性タンパク質（ＵＣＲＰ、インターフェロン刺激遺伝子－１５（ＩＳＧ１５）としても知られる）、ユビキチン関連修飾因子－１（ＵＲＭ１）、神経前駆細胞が発現する発達的に下方制御されたタンパク質－８（ＮＥＤＤ８、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいてＲｕｂ１とも呼ばれる）、ヒト白血球抗原Ｆ関連（ＦＡＴ１０）、オートファジー－８（ＡＴＧ８）および－１２（ＡＴＧ１２）、Ｆａｕユビキチン様タンパク質（ＦＵＢ１）、膜固定ＵＢＬ（ＭＵＢ）、ユビキチン折りたたみ修飾因子－１（ＵＦＭ１）、およびユビキチン様タンパク質－５（ＵＢＬ５）が挙げられる。

【０５０１】

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

【０５０２】

追加の実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤を特異的なオルガネラ、細胞型、組織、または臓器に標的化し得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤をミトコンドリアに標的化し得る。

【０５０３】

さらなる実施形態では、異種機能ドメインは、エフェクタードメインであってもよい。ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤がその標的配列に指向されるとき、例えば、ＣａｓヌクレアーゼがｇＲＮＡによって標的配列に指向されるとき、エフェクタードメインは、標的配列を修飾するか、または影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、エフェクタードメインは、核酸結合ドメイン、ヌクレアーゼドメイン（例えば、非ＣａｓヌクレアーゼドメインＣａｓヌクレアーゼドメイン）、エピジェネティック修飾ドメイン、転写活性化ドメイン、または転写抑制ドメインから選択され得る。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、ヌクレアーゼ、例え

ばＦｏｋＩヌクレアーゼである。例えば、米国特許第９，０２３，６４９号を参照のこと。いくつかの実施形態では、異種機能ドメインは、転写活性化因子または転写抑制因子である。例えば、Ｑｉ ｅｔ ａｌ．，“Ｒｅｐｕｒｐｏｓｉｎｇ ＣＲＩＳＰＲ ａｓ ａｎ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ ｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ”，Ｃｅｌｌ １５２：１１７３－８３（２０１３）、Ｐｅｒｅｚ－Ｐｉｎｅｒａ ｅｔ ａｌ．，“ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｇｅｎｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｂｙ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９－ｂａｓｅｄ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒｓ”，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １０：９７３－６（２０１３）、Ｍａｌｉ ｅｔ ａｌ．，“ＣＡＳ９ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｏｒｓ ｆｏｒ ｔａｒｇｅｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ ａｎｄ ｐａｉｒｅｄ ｎｉｃｋａｓｅｓ ｆｏｒ ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ”，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１：８３３－８（２０１３）、Ｇｉｌｂｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，“ＣＲＩＳＰＲ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｍｏｄｕｌａｒ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｉｎ ｅｕｋａｒｙｏｔｅｓ”，Ｃｅｌｌ １５４：４４２－５１（２０１３）を参照のこと。したがって、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤は、本質的に、ガイドＲＮＡを使用して所望の標的配列に結合するように指向され得る転写因子になる。

【０５０４】

Ｅ．ｇＲＮＡの有効性の決定

いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡの有効性は、送達されたとき、またはＲＮＰを形成する他の構成要素とともに発現されたときに決定される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡ結合剤、例えば、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９とともに発現される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはニッカーゼを既に安定に発現する細胞株に送達されるか、またはその細胞株において発現される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＰの一部として細胞に送達される。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼまたはニッカーゼ、例えば、Ｃａｓ９ヌクレアーゼまたはニッカーゼをコードするｍＲＮＡとともに細胞に送達される。

【０５０５】

本明細書に記載される場合、本明細書に開示されるＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼおよびガイドＲＮＡの使用は、二本鎖切断（ＤＳＢ）、一本鎖切断、および／またはＤＮＡにおいて核酸修飾を引き起こす部位特異的結合を引き起こす場合があり、細胞機構による修復時に挿入／欠失（インデル）変異の形態でエラーを生じ得る。インデルに起因する多くの変異は、リーディングフレームを変化させるか、または未成熟終止コドンを導入し、したがって、非機能性タンパク質を産生する。

【０５０６】

いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、インビトロモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、Ｃａｓ９を安定して発現するＨＥＫ２９３細胞である（ＨＥＫ２９３＿Ｃａｓ９）。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、ＨＵＨ７ヒト肝臓がん細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、ＨｅｐＧ２細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、初代ヒト肝細胞である。いくつかの実施形態では、インビトロモデルは、初代カニクイザル肝細胞である。初代ヒト肝細胞を使用することに関して、市販の初代ヒト肝細胞を使用して、実験間のより高い一貫性を提供することができる。いくつかの実施形態では、インビトロモデルにおいて（例えば、初代ヒト肝細胞において）欠失または挿入が起こるオフターゲット部位の数は、例えば、インビトロでＣａｓ９ ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムＤＮＡを分析することによって、決定される。いくつかの実施形態では、そのような決定は、インビトロでＣａｓ９ ｍＲＮＡ、

ガイドＲＮＡ、およびドナーオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた初代ヒト肝細胞由来のゲノムＤＮＡを分析することを含む。そのような決定のための例示的な手順を以下の作業実施例に提供する。

【０５０７】

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

【０５０８】

いくつかの実施形態では、特定のｇＲＮＡの有効性は、インビボモデルに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、インビボモデルは、げっ歯類モデルである。いくつかの実施形態では、げっ歯類モデルは、ＫＬＫＢ１遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態では、げっ歯類モデルは、ヒトＫＬＫＢ１遺伝子を発現するマウスである。いくつかの実施形態では、インビボモデルは、非ヒト霊長類、例えばカニクイザルである。

【０５０９】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＫＬＫＢ１の編集率によって測定される。インデルの割合は、ＮＧＳシークエンシングから計算することができる。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１の編集率を、例えば、インビトロモデルの場合は細胞培地または細胞溶解物から、またはインビボモデルの場合は循環レベルを含有する血漿から、プレカリクレインおよび／またはカリクレインタンパク質のノックダウンを達成するために必要な編集率と比較する。

【０５１０】

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

【０５１１】

いくつかの実施形態では、線形増幅は、標的ＤＮＡにおける挿入／欠失（「インデル」）変異、転座、および相同性誘導修復（ＨＤＲ）事象の形成等の遺伝子編集事象を検出するために使用される。例えば、固有の配列タグ化プライマーを用いた線形増幅、およびタグ化された増幅産物を単離すること（本明細書では、「ＵｎＩＴ」、または「固有識別子タグ化（Ｕｎｉｑｕｅ　Ｉｄｅｎｔｉｆｉｅｒ　Ｔａｇｍｅｎｔａｔｉｏｎ）」方法と称する）を使用してもよい。

【０５１２】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、体液、例えば、血清、血漿、または血液等の試料中のＫＬＫＢ１、ｐＫａｌ、総ＫＬＫＢ１（プレカリクレイン＋ｐＫａｌ

）、ＫＬＫＢ１活性、ＨＭＷＫ、ＨＭＷＫ活性、および／またはブラジキニンのレベルを測定することによって決定される。

【０５１３】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルを測定することによって決定される。ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルの減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。

【０５１４】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清、血漿、または血液等の体液等の試料におけるブラジキニンのレベルを測定することによって決定される。

【０５１５】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、試料中のブラジキニンおよび／またはその分解産物のレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿中のブラジキニンおよび／またはその分解産物のレベルを測定することによって決定される。血清または血漿におけるブラジキニンおよび／またはその分解産物のレベルの低下は、有効なガイドＲＮＡを示す。

【０５１６】

循環血液中のブラジキニンを検出する１つの方法は、Ｆｅｒｒｅｉｒａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．（１９６７），２９，３６７－３７７に提供される。ブラジキニンはまた、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて測定され得る。（例えば、Ａｂｃａｍ　Ｃａｔ．Ｎｏ．ａｂ１３６９３６、Ｍａｒｋｉｔ－Ｍ　Ｂｒａｄｙｋｉｎｉｎ（Ｇｅｎｔａｕｒ）を参照されたい。）いくつかの実施形態では、ブラジキニンのレベルは、編集を測定するために使用されるのと同じインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ブラジキニンのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において測定される。いくつかの実施形態では、ブラジキニンのレベルは、血清または血漿等の流体において測定される。いくつかの実施形態では、ブラジキニンの循環レベルが測定される。

【０５１７】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、試料における総カリクレイン（プレカリクレインおよび血漿カリクレイン（ｐＫａｌ））のレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清、血漿、または血液等の体液等の試料における総カリクレインのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿における総カリクレインのレベルを測定することによって決定される。血清または血漿における総カリクレインのレベルの減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、血清および／または血漿総カリクレインは、基底レベルの４０％未満に減少する。いくつかの実施形態では、総カリクレインのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態では、総カリクレインのレベルは、編集を測定するために使用されるのと同じインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、総カリクレインのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において測定される。いくつかの実施形態では、総カリクレインのレベルは、ＰＨＨおよびＰＣＨ細胞において測定される。

【０５１８】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清、血漿、または血液等の体液等の試料におけるプレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿におけるプレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルを測定することによって決定される。血清または血漿におけるプレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルの減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、プレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素

結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルは、編集を測定するために使用されるインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において、血漿において、または細胞培地において測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルは、血漿試料から測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインおよび／またはカリクレインのレベルは、血清試料から測定される。プレカリクレインおよび／またはｐＫａｌタンパク質レベルは、任意選択で、プレカリクレインをその活性形態であるｐＫａｌに変換するための活性化ステップ後にＥＬＩＳＡによって測定される。

【０５１９】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、試料におけるプレカリクレインのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清、血漿、または血液等の体液等の試料におけるプレカリクレインのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿におけるプレカリクレインのレベルを測定することによって決定される。血清または血漿におけるプレカリクレインのレベルの減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、血清および／血漿プレカリクレインは、少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、またはそれより大きく低下する。いくつかの実施形態では、血清および／血漿総カリクレイン、プレカリクレインおよび／またはカリクレインは、約６０～８０％、６０～９０％、６０～９５％、６０～１００％、８５～９５％、または８５～１００％減少する。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、編集を測定するために使用されるインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において、血漿において、または細胞培地において測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、血漿試料から測定される。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、血清試料から測定される。

【０５２０】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、試料におけるｐＫａｌのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿におけるｐＫａｌのレベルを測定することによって決定される。血清または血漿におけるｐＫａｌのレベルの減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、またはそれより大きく低下する。いくつかの実施形態では、血清および／血漿ｐＫａｌは、約６０～８０％、６０～９０％、６０～９５％、６０～１００％、８５～９５％、または８５～１００％減少する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）アッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、編集を測定するために使用されるインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において、血漿において、または細胞培地において測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、血漿試料から測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、血清試料から測定される。

【０５２１】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、クエン酸血清またはクエン酸血漿における循環切断ＨＭＷＫ（ｃＨＭＷＫ）および総ＨＭＷＫのレベルを測定することによって決定される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿における循環切断型ＨＭＷＫ（ｃＨＭＷＫ）および総ＨＭＷＫのレベルを測定することによ

って決定される。総ＨＭＷＫと比較した切断ＨＭＷＫの割合の減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、総ＨＭＷＫと比較した切断ＨＭＷＫの割合は、約６０％未満の総ＨＭＷＫに対する循環血漿ｃＨＭＷＫの比率を標的にすることができる。いくつかの実施形態では、ＨＭＷＫに対するｃＨＭＷＫの比率は、約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、５０％より小さいか、またはそれより大きい値より小さい。いくつかの実施形態では、プレカリクレインのレベルは、細胞培地または血清または血漿を用いたウエスタンブロッティングアッセイを用いて測定される。いくつかの実施形態では、ｃＨＭＷＫおよび総ＨＭＷＫのレベルは、編集を測定するために使用されるインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ｃＨＭＷＫおよび総ＨＭＷＫのレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において、血漿において、または細胞培地において測定される。いくつかの実施形態では、ｃＨＭＷＫおよび総ＨＭＷＫのレベルは、血漿試料から測定される。いくつかの実施形態では、ｃＨＭＷＫおよび総ＨＭＷＫのレベルは、血清試料から測定される。

【０５２２】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、試料におけるｐＫａｌ活性を測定することによって決定される。ｐＫａｌ活性の減少は、有効なガイドＲＮＡを示す。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡの有効性は、血清または血漿におけるｐＫａｌ活性を測定することによって決定される。

【０５２３】

いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、クエン酸血清試料またはクエン酸血漿試料がＨＭＷＫをｃＨＭＷＫに変換する能力として測定される（Ｂａｎｅｒｊｉ　ｅｔ　ａｌ，，Ｎ　Ｅｎｇｌ　Ｊ　Ｍｅｄ　２０１７；３７６：７１７－２８を参照されたい）。総ＨＭＷＫに対するｃＨＭＷＫの最終的な割合の減少は、ｐＫａｌ活性の減少を示す。ｃＨＭＷＫおよび全長ＨＭＷＫのレベルは、ウエスタンブロッティングによって測定することができる。他の実施形態では、ｐＫａｌ活性は、クエン酸血清試料またはクエン酸血漿試料がＨＷＭＫ様ペプチド基質を酵素的に切断する能力として測定され、その場合、基質切断の減少は、ｐＫａｌ活性の減少を示す。

【０５２４】

いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、少なくとも４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、またはそれより大きく低下する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、約６０～８０％、６０～９０％、６０～９５％、６０～１００％、８５～９５％、または８５～１００％減少する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、基底レベルの約４０％未満まで低下する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、基底レベルの約４０～５０％まで低下する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性は、基底レベルの２０～４０または２０～５０％まで低下する。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性のレベルは、編集を測定するために使用されるインビトロまたはインビボ系またはモデルにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性のレベルは、細胞、例えば、初代ヒト肝細胞において、血漿において、または細胞培地において測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌ活性のレベルは、血漿試料から測定される。いくつかの実施形態では、ｐＫａｌのレベルは、血清試料から測定される。

【０５２５】

ＩＩＩ．治療方法

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、ＨＡＥを治療および予防し、ＨＡＥの症状を予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、ＨＡＥ発作の頻度を低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、ＨＡＥ発作を予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、ブラジキニン産生および蓄積、ブラジキニン誘発性腫脹、気道の血管浮腫閉塞、または窒息を治療または予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、ＨＡＥによって引き起こされる血管浮腫および発作を治療または予防す

るのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、ＨＡＥ発作等の血管浮腫発作の頻度を低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、血管浮腫発作の重症度を低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、ＨＡＥ発作等の血管浮腫発作の頻度および／または重症度を低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、ＨＡＥ発作等の血管浮腫発作の寛解を達成するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡは、例えば、少なくとも１ヶ月、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、５年、１０年、またはさらに長く維持される、持続性寛解を達成するのに有用である。

【０５２６】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡ産生を減少させるのに有用である。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルを測定することによって評価することができ、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルの増加が有効性を示す。

【０５２７】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、血漿および血清におけるプレカリクレインタンパク質レベルを減少させるのに有用である。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、プレカリクレインタンパク質レベルまたは総カリクレインタンパク質レベルを測定することによって評価することができ、プレカリクレインおよび／またはカリクレインタンパク質の減少は、有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料におけるプレカリクレインタンパク質を測定することによって評価することができ、プレカリクレインの減少が、有効性を示す。例えば、血漿または血清プレカリクレインは、Ｆｅｒｒｏｎｅ　ＪＤ，Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｊｅｅ　Ｇ，Ｒｅｖｅｎｋｏ　ＡＳ，ｅｔ　ａｌ．ＩＯＮＩＳ－ＰＫＫ$_{Rx}$　ａ　Ｎｏｖｅｌ　Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ　ｏｆ　Ｐｒｅｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ　ａｎｄ　Ｂｒａｄｙｋｉｎｉｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｔｈｅｒ．２０１９；２９（２）：８２－９１によって記載されるＥＬＩＳＡによって測定することができる。同様に、カリクレインは、本明細書に記載されるように、ＥＬＩＳＡによって測定することができ、本明細書に開示されるｇＲＮＡの投与は、血漿または血清におけるカリクレインタンパク質レベルを減少させることができる。

【０５２８】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、血漿および血清における総カリクレイン（プレカリクレインおよびｐＫａｌ）タンパク質レベルを減少させるのに有用である。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、総カリクレイン（プレカリクレインおよびｐＫａｌ）タンパク質レベルを測定することによって評価することができ、総カリクレインタンパク質の減少は、有効性を示す。総カリクレイン、プレカリクレイン、および／またはカリクレインは、血漿カリクレインを放出するための活性化の前または後に測定されてもよい。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料におけるプレカリクレインおよび／またはｐＫａｌタンパク質を測定することによって評価することができ、プレカリクレインタンパク質の減少が、有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料におけるｐＫａｌタンパク質を測定することによって評価することができ、ｐＫａｌタンパク質の減少が、有効性を示す。例えば、プレカリクレインおよびｐＫａｌタンパク質のレベルは、例えば、プレカリクレインおよびカリクレインヒトＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）を使用することによって、ＥＬＩＳＡによって測定することができる。プレカリクレインおよび／またはｐＫａｌタンパク質レベルは、任意選択で、プレカリクレインをその活性形態であるｐＫａｌに変換するための活性化ステップ後にＥＬＩＳＡによって測定される。

【０５２９】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、クエン酸血清ま

たはクエン酸血漿における総ＨＭＷＫと比較して、循環切断ＨＭＷＫ（ｃＨＭＷＫ）の割合を減少させるのに有用である。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、総ＨＭＷＫおよびｃＨＭＷＫタンパク質レベルを測定することによって評価することができ、切断ＨＭＷＫの割合の減少が、有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料における総ＨＭＷＫおよびｃＨＭＷＫタンパク質レベルを測定することによって評価することができ、ｃＨＭＷＫの割合の減少が、有効性を示す。例えば、クエン酸血清またはクエン酸血漿試料における総ＨＭＷＫと比較したｃＨＭＷＫの割合は、Ｓｕｆｆｒｉｔｔｉ Ｃ，Ｚａｎｉｃｈｅｌｌｉ Ａ，Ｍａｇｇｉｏｎｉ Ｌ，Ｂｏｎａｎｎｉ Ｅ，Ｃｕｇｎｏ Ｍ，Ｃｉｃａｒｄｉ Ｍに記載されるようなウエスタンブロッティングによって測定することができる。高分子量キニノゲン切断は、遺伝性Ｃ１阻害剤欠損に起因するブラジキニン媒介性血管浮腫における疾患状態と相関する。Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ａｌｌｅｒｇｙ ２０１４；４４：１５０３－１４、およびＢａｎｅｒｊｉ Ａ，Ｂｕｓｓｅ Ｐ，Ｓｈｅｎｎａｋ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｈｉｂｉｔｉｎｇ ｐｌａｓｍａ ｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ ｆｏｒ ｈｅｒｅｄｉｔａｒｙ ａｎｇｉｏｅｄｅｍａ ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８。

【０５３０】

総ＨＭＷＫの約３０％未満の循環血漿ｃＨＭＷＫレベルは、ラナデルマブで治療した患者におけるＨＡＥ発作の減少と関連していた（Ｂａｎｅｒｊｉ，ｅｔ ａｌ，２０１７を参照されたい）。同じ試験では、健常な対照は、ｃＨＭＷＫの血漿レベルが総ＨＭＷＫの約８．３％であった。別の試験では、Ｓｕｆｆｒｉｔｉらは、正常対照では約３４．８％、寛解期のＨＡＥ患者では約４１．４％、発作中のＨＡＥ患者では約５８．１％の平均のｃＨＭＷＫ血漿レベルを見出した（Ｓｕｆｆｒｉｔｔｉ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ａｌｌｅｒｇｙ ２０１４；４４：１５０３－１４）。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、対象がＨＡＥ発作の数の減少を示すように循環ｃＨＭＷＫレベルを低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、クエン酸血漿における対象のｃＨＭＷＫの割合を３０％未満に低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、クエン酸血漿における対象のｃＨＭＷＫの割合を３０％、２０％、および／または１０％未満に低下させるのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、クエン酸血漿における対象のｃＨＭＷＫの割合を、およそ健康な対照の割合に低下させるのに有用である。

【０５３１】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、血清または血漿における自発的ｐＫａｌ活性を減少させるのに有用であり得る。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、自発的ｐＫａｌ活性を測定することによって評価することができ、自発的ｐＫａｌ活性の減少が、有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料における自発的ｐＫａｌ活性を測定することによって評価することができ、自発的ｐＫａｌ活性の減少が、有効性を示す。特定の実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、循環ｐＫａｌおよび循環ｐＫａｌ活性の基底レベルを減少させるのに有用である。

【０５３２】

本明細書に開示されるｇＲＮＡならびに関連する方法および組成物は、血清または血漿における誘導性ｐＫａｌ活性を減少させるのに有用であり得る。したがって、一態様では、治療／予防の有効性は、誘導性ｐＫａｌ活性を測定することによって評価することができ、誘導性ｐＫａｌ活性の減少が、有効性を示す。いくつかの実施形態では、治療／予防の有効性は、血清または血漿等の試料における誘導性ｐＫａｌ活性を測定することによって評価することができ、誘導性ｐＫａｌ活性の減少が、有効性を示す。いくつかの例では、ｐＫａｌ活性は、試料をＦＸＩＩａに曝露することによって誘導することができる（Ｂ

ａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ，，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８を参照されたい）。いくつかの例では、ｐＫａｌ活性は、試料をデキストラン硫酸塩とともにインキュベーションすることによって誘導され得る（Ｆｅｒｒｏｎｅ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｔｈｅｒ．２０１９；２９（２）：８２－９１を参照されたい）。いくつかの例では、ｐＫａｌ活性は、試料にエラグ酸を添加することによって誘導することができる（Ａｙｇｏｒｅｎ－Ｐｕｒｓｕｎ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１６；１３８：９３４－９３６）。

【０５３３】

いくつかの例では、ｐＫａｌ活性は、クエン酸血清試料またはクエン酸血漿試料がＨＭＷＫをｃＨＭＷＫに変換する能力として測定され（Ｂａｎｅｒｊｉ ｅｔ ａｌ，，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８を参照されたい）、総ＨＭＷＫに対するｃＨＭＷＫの最終的な割合の減少は、ｐＫａｌ活性の減少を示す。ｃＨＭＷＫおよび全長ＨＭＷＫの割合は、例えば、Ｓｕｆｆｒｉｔｔｉ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｅｘｐ Ａｌｌｅｒｇｙ ２０１４；４４：１５０３－１４に記載されるように、ウエスタンブロッティングによって測定することができる。他の例では、ｐＫａｌ活性は、クエン酸血清試料またはクエン酸血漿試料がＨＷＭＫ様ペプチド基質を酵素的に切断する能力として測定され、その場合、基質切断の減少は、ｐＫａｌ活性の減少を示す。一例では、基質ペプチドは、発色基質Ｈ－Ｄ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－ｐ－ニトロアニリドペプチドであってもよく（Ｂａｃｈｅｍ，Ｃａｔ．Ｌ－２１２０）、切断は、Ａ４０５における変化として測定することができる（Ｄｅｆｅｎｄｉ ｅｔ ａｌ，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ２０１３；８：ｅ７０１４０を参照されたい）。別の例では、基質ペプチドは、蛍光発生基質Ｈ－Ｐｒｏ－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－ＡＭＣ（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号Ｐ９２７３）であってもよく、切断は、それぞれ３６０ｎｍおよび４８０ｎｍでの励起波長および発光波長としての蛍光変化として測定することができる（Ｂａｎｅｒｊｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８を参照されたい）。

【０５３４】

ある試験では、誘導ｐＫａｌ活性が４０％より大きく低下したことは、ＨＡＥ発作の低下と関連していた（Ｂａｎｅｒｊｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８）。誘導ｐＫａｌ活性が少なくとも５０％低下したことは、ＢＣＸ７３５３による治療でのＨＡＥ発作の低下と関連していた（Ａｙｇｏｒｅｎ－Ｐｕｒｓｕｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１８；３７９：３５２－３６２）。誘導ｐＫａｌ活性が６０％低下したことは、ラナデルマブによる治療での発作の低下と関連していた（Ｂａｎｅｒｊｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ ２０１７；３７６：７１７－２８）。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡおよび組成物の投与は、対象がより少ないＨＡＥ発作を示すように、カリクレイン活性（例えば、総カリクレイン、プレカリクレイン、および／またはｐＫａｌ活性）を低下させるのに有用である。

【０５３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡおよび組成物の投与は、対象のｐＫａｌ活性を基底レベルの約４０％未満まで低下させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡおよび組成物の投与は、対象のｐＫａｌ活性を基底レベルの約４０～５０％未満まで低下させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡおよび組成物の投与は、対象のｐＫａｌ活性を基底レベルの２０～４０％または２０～５０％未満まで低下させる。

【０５３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか１つ以上は、対象において疾患または障害を治療または予防するための医薬を調製する際に使用するためのものである。いくつかの実施形態では、治療および／または予防は、医薬／組成物の単回用量、例えば、一度治療によって達成される。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、ＨＡＥである。

【０５３７】
いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか１つ以上を投与することを含む、対象において疾患または障害を治療または予防する方法を含む。いくつかの実施形態では、疾患または障害は、ＨＡＥである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤は、例えば、一度に単回用量として投与される。いくつかの実施形態では、単回用量は、持続的な治療および／または予防を達成する。いくつかの実施形態では、本方法は、持続的な治療および／または予防を達成する。持続的な治療および／または予防は、本明細書で使用される場合、少なくともｉ）３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５週間、ｉｉ）１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１８、２４、３０、または３６ヶ月間、またはｉｉｉ）１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０年間続く治療および／または予防を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤の単回用量は、対象の生存期間にわたって本明細書に記載される適応症のいずれかを治療および／または予防するのに十分である。

【０５３８】
いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか１つ以上を投与または送達することを含む、標的ＤＮＡを修飾する（例えば、二本鎖切断を作成する）方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、標的ＤＮＡは、ＫＬＫＢ１遺伝子である。いくつかの実施形態では、標的ＤＮＡは、ＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン内にある。いくつかの実施形態では、標的ＤＮＡは、ＫＬＫＢ１遺伝子のエクソン１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５の中にある。

【０５３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるｇＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤のうちのいずれか１つ以上を投与または送達することを含む、標的遺伝子の調節のための方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、調節は、ＫＬＫＢ１標的遺伝子の編集である。いくつかの実施形態では、調節は、ＫＬＫＢ１標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の変化である。

【０５４０】
いくつかの実施形態では、方法または使用は、遺伝子編集をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的ＫＬＫＢ１遺伝子内の二本鎖切断をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、ＤＳＢの非相同性末端結合中にインデル変異の形成をもたらす。いくつかの実施形態では、方法または使用は、標的ＫＬＫＢ１遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失をもたらす。いくつかの実施形態では、標的ＫＬＫＢ１遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失は、非機能性タンパク質をもたらすフレームシフト突然変異または未成熟終止コドンをもたらす。いくつかの実施形態では、標的ＫＬＫＢ１遺伝子におけるヌクレオチドの挿入または欠失は、標的遺伝子発現のノックダウンまたは除去をもたらす。

【０５４１】
いくつかの実施形態では、方法または使用は、ＫＬＫＢ１遺伝子調節をもたらす。いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１遺伝子調節は、遺伝子発現の低減である。いくつかの実施形態では、方法または使用は、細胞の集合またはインビボでの標的遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の減少をもたらす。

【０５４２】
いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１遺伝子内で二本鎖切断（ＤＳＢ）を誘導する方法であって、配列番号１～１４９のうちのいずれか１つ以上のガイド配列を含むガイドＲＮＡを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むｇＲＮＡは、ＫＬＫＢ１遺伝子においてＤＳＢを誘導するために投与される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮ

ＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４３】

いくつかの実施形態では、ＫＬＫＢ１遺伝子を修飾する方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むｇＲＮＡは、ＫＬＫＢ１遺伝子を修飾するために投与される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４４】

いくつかの実施形態では、遺伝性血管浮腫（ＨＡＥ）を治療または予防する方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを含む組成物を投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むｇＲＮＡが投与され、ＨＡＥを治療または予防する。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４５】

いくつかの実施形態では、ブラジキニン産生および蓄積を減少させるか、またはなくす方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを投与することを含む、方法が提供される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４６】

いくつかの実施形態では、ブラジキニン誘発性腫脹を治療または予防する方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを投与することを含む、方法が提供される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４７】

いくつかの実施形態では、ブラジキニン誘発性腫脹を治療または予防する方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを投与することを含む、方法が提供される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４８】

いくつかの実施形態では、気道の閉塞および／または窒息を治療または予防する方法であって、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡを投与することを含む、方法が提供される。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼＣ、例えば、ＣａｓヌクレアーゼＣ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５４９】

いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むｇＲＮＡが投与され、血漿、血清、または血液におけるブラジキニンレベルを低下させる。ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５５０】

いくつかの実施形態では、配列番号１～１４９のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むｇＲＮＡが投与され、血清または血漿におけるブラジキニンを減少させる。ｇＲＮＡは、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）もしくはｍＲＮＡ、またはＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）をコードするベクターとともに投与され得る。

【０５５１】

いくつかの実施形態では、表１のガイド配列を、ＲＮＡガイドＤＮＡヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓヌクレアーゼと一緒に含むｇＲＮＡは、ＤＳＢを誘導し、修復中の非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）が、ＫＬＫＢ１遺伝子内の突然変異をもたらす。いくつかの実施形態では、ＮＨＥＪは、ヌクレオチドの欠失または挿入を引き起こし、ＫＬＫＢ１遺伝子におけるフレームシフトまたはナンセンス突然変異を誘導する。

【０５５２】

いくつかの実施形態では、本発明のガイドＲＮＡ（例えば、本明細書で提供される組成物で）を投与することは、対象における総カリクレイン、プレカリクレイン、および／またはカリクレインのレベル（例えば、血清または血漿レベル）を減少させ、したがって、ブラジキニン過剰産生および蓄積を予防する。いくつかの実施形態では、本発明のガイドＲＮＡ（例えば、本明細書で提供される組成物で）を投与することは、対象におけるカリクレイン活性レベル（例えば、血清または血漿レベル）を減少させ、したがって、ブラジキニン過剰産生および蓄積を予防する。

【０５５３】

いくつかの実施形態では、本発明において提供される方法は、血管細胞を通って組織への流体漏出を含む、より少ない発作を引き起こす。いくつかの実施形態では、本発明において提供される方法は、臓器組織における腫脹を増加させる発作の頻度を低下させる。いくつかの実施形態では、本発明のガイドＲＮＡを（例えば、本明細書で提供される組成物中で）投与することは、血管浮腫発作の頻度または重症度を減少させる。

【０５５４】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、霊長類、例えば、ヒトである。

【０５５５】

いくつかの実施形態では、表１または表２のガイド配列のうちのいずれか１つ以上を含むガイドＲＮＡ（例えば、本明細書で提供される組成物で）の使用は、ＨＡＥを有するヒト対象を治療するための医薬の調製のために提供される。

【０５５６】

いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、および製剤は、静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、および製剤は、注入によって投与される。いくつかの実施形態では、ガイドＲＮＡ、組成物、および製剤は、肝循環に投与される。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるガイドＲＮＡを含む組成物の単回投与は、タンパク質の発現をノックダウンするのに十分である。他の実施形態では、本明細書で提供されるガイドＲＮＡを含む組成物の１回を超える投与は、治療効果を最大化するのに有益であり得る。

【０５５８】

いくつかの実施形態では、治療は、ＨＡＥ疾患の進行を遅らせるか、または止める。

【０５５９】

いくつかの実施形態では、治療は、血管浮腫の進行を遅らせるか、または止める。いくつかの実施形態では、治療は、ＨＡＥの症状を改善し、安定化し、または変化を遅らせる。

【０５６０】

Ａ．ｇＲＮＡ組成物の送達

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、ヌクレオチドおよびタンパク質カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるガイドＲＮＡ、組成物、または薬学的製剤の送達に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、核酸、タンパク質、または核酸をタンパク質とともに送達する。

【０５６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるｇＲＮＡのいずれか１つを対象に送達する方法を含み、ｇＲＮＡは、ＬＮＰと会合する。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰはまた、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡと会合する。

【０５６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、開示されるｇＲＮＡおよびＬＮＰのうちのいずれか１つを含む組成物を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡをさらに含む。

【０５６３】

いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、陽イオン性脂質を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）とも称される、（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート、または別のイオン化可能な液体を含む。例えば、ＷＯ／２０１７／１７３０５４の脂質およびその中に記載される参照文献を参照のこと。いくつかの実施形態では、ＬＮＰは、約４．５、５．０、５．５、６．０、または６．５のＲＮＡホスフェートに対する陽イオン性脂質アミンのモル比（Ｎ：Ｐ）を含む。いくつかの実施形態では、ＬＮＰ脂質の文脈において、陽イオン性およびイオン化可能との用語は、互換可能であり、例えば、イオン化可能な脂質は、ｐＨに応じて陽イオン性である。

【０５６４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｇＲＮＡと会合するＬＮＰは、疾患または障害を治療するための医薬の調製において使用するためのものである。

【０５６５】

エレクトロポレーションは、カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるｇＲＮＡのうちのいずれか１つの送達のために、任意のエレクトロポレーション方法論が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示されるｇＲＮＡおよびＣａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡのうちのいずれか１つを送達するために使用され得る。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるｇＲＮＡのうちのいずれか１つをエクスビボで細胞に送達する方法を含み、ｇＲＮＡは、ＬＮＰと会合するか、またはＬＮＰと会合しない。いくつかの実施形態では、ｇＲＮＡ／ＬＮＰまたはｇＲＮＡはまた、Ｃａｓ９またはＣａｓ９をコードするｍＲＮＡと会合する。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるガイドＲＮＡ組成物は、単独で、または１つ以上のベクターにコードされて、脂質ナノ粒子に製剤化され、または脂質ナノ粒子を介して投与される。例えば、その内容が参照によりそれらの全体が本明細書に組み込ま

れる、ＷＯ／２０１７／１７３０５４およびＷＯ２０１９／０６７９９２を参照されたい。

【０５６８】

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

【０５６９】

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

【０５７０】

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

【実施例】

【０５７１】

以下の実施例は、特定の開示された実施形態を例示するために提供され、本開示の範囲を決して限定するものとして解釈されるべきではない。

【０５７２】

実施例１：材料および方法

１．１　ヌクレアーゼｍＲＮＡのインビトロ転写（「ＩＶＴ」）

Ｎ１－メチルプソイド－Ｕを含有するキャップされたポリアデニル化Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ（「Ｓｐｙ」）Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを、線状プラスミドＤＮＡテンプレートおよびＴ７　ＲＮＡポリメラーゼを用いたインビトロ転写によって生成した。Ｔ７プロモーター、および本明細書に記載のｍＲＮＡを含むｍＲＮＡを産生するための転写のための配列を含有するプラスミドＤＮＡ（Ｃａｓ９　ＯＲＦについては、以下の表５の配列番号５０１～５１６を参照されたい）を、３７℃でインキュベートすることによって線状化して、以下の条件でＸｂａＩによる消化を完了させた。２００ｎｇ／μＬのプラスミド、２Ｕ／μＬのＸｂａＩ（ＮＥＢ）、および１倍反応緩衝液。ＸｂａＩを、反応物を６５℃で２０分間加熱することによって不活性化した。線状プラスミドを、シリカマキシスピンカラム（Ｅｐｏｃｈ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用い、酵素および緩衝塩から精製し、アガロースゲルによって分析し、線状化を確認した。Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを生成するためのＩＶＴ反応を、３７℃で４時間、以下の条件下でインキュベートした。５０ｎｇ／μＬの直線化プラスミド；各２ｍＭのＧＴＰ、ＡＴＰ、ＣＴＰ、およびＮ１－メチルシュードＵＴＰ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；１０ｍＭのＡＲＣＡ（Ｔｒｉｌｉｎｋ）；５Ｕ／μＬのＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）；１Ｕ／μＬのマウスＲＮａｓｅ阻害剤（ＮＥＢ）；０．００４Ｕ／μＬの無機Ｅ．ｃｏｌｉピロホスファターゼ（ＮＥＢ）；ならびに１倍反応緩衝液。４時間のインキュベーション後、ＴＵＲＢＯ　ＤＮａｓｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を、最終濃度が０．０１Ｕ／μＬになるように添加し、反応物をさらに３０分間インキュベートして、ＤＮＡテンプレートを除去した。ＭｅｇａＣｌｅａｒ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｃｌｅａｎ－ｕｐキットを使用し、製造者のプロトコル（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）に従って、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡを酵素およびヌクレオチドから精製した。あるいは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡをＬｉＣｌ沈殿法で精製し、いくつかの場合では、これに続いてタンジェンシャルフロー濾過によりさらなる精製を行った。転写産物濃度を、２６０ｎｍ（Ｎａｎｏｄｒｏｐ）での光吸光度を測定することによって決定し、転写産物をＢｉｏａｎｌａｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ）によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【０５７３】

【表１３】

表５：例示的なＣａｓ９　ｍＲＮＡ配列

配列番号	配列
501	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGAC
	AAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG
	CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCG
	GAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCT
	GCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAG
	AAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATC
	TACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGAT
	CAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGG
	TCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGA
	CTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCCAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGA
	TCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAG
	GACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAA
	CCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGA
	TCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAG
	GAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTT
	CATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAG
	CAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAG
	ACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGC
	TGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGT
	CGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCC
	TGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATG
	AGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGT
	CAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCA
	ACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGAC
	ATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACA
	CCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATC
	AACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCAT
	GCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
	CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACT
	GGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGA
	CAGAAGAACAGCAGAGAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC
	CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCA

10

20

30

40

50

【表１４】

	GGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCG
	ACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT
	GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGA
	GGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACACAAAGCACGTCG
	CACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTG
	AAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACGCACA
	CGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAG
	ACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTC
	TACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAAC
	AAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG
	GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACA
	AGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTG
	GTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAA
	GAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG
	CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAACGGAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAA
	ACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAA
	GACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAGCAGATCAGCGAATTCAG
	CAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGA
	GAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAAC
	AATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACG
	AAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGAGGAAGCCCGAAGAAGAAAGGTCTAGCTAGCCAT
	CACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTT
	TCGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAAT
	AAAAAATGGAAAGAACCTCGAG
502	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAG
	AGGUCCUGGGAAACACAGACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAG
	GAGAACAGCAAGAAGAAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGC
	UUCCACAGACUGGAAGAAAGGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUC
	AAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCU
	AAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGG
	GUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGGCAAGAGCAGAAG
	CAGCUGCCGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAG
	AAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUA
	GCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCG
	CGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAAGUACAAGGAAAUCUU

10

20

30

40

50

【表１５】

GGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUG	503
UGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACC	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCCAUCGGAACAAACAGCGUCACUACAGACGAAGUCCUGGGAAACAGAUC
CCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU	CCGAGAAGGUCAAGUCGGUGAAGGAGCUGCUGGGGAUCACAUCAUGGAAAGAAGCCCUUCCUGGAGAACCCGGUGAAC
CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGGAACUUCGAAGAA	UCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGGAGACAGCAUCGACUUGAUCCACUUGACCCUGACACAACCUGACAA
GCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCU	AGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGA	ACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGGUCAAGGUCAUCCACACUGAAGAGCUGGUCAGCGACUUC
GUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAG	ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAA	AGCGAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACA
UGGAGCUGAAGAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGA	UGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACG	GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC
CUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGA	UCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC	GAGCGAACUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUGGUCGAGACCCGCCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG
AGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGA	ACAAGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAA	ACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGGUCAAGGUCAUCCACACUGAAGAGCUGGUCAGCGACUUC
GAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACA	GAGCGAACUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUGGUCGAGACCCGCCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG	ACAAGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAA
UGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACG	AGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGA	AGCGAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACA
GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUGGCCCAG	UCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAA	GAGCGAACUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUGGUCGAGACCCGCCAGAUCACCAAGCACGUGGCCCAG
ACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGGUCAAGGUCAUCCACACUGAAGAGCUGGUCAGCGACUUC	ACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA	AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAGAUUCGGAAAAG
UCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCG	AGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAA	GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGGAGACUGGGACCCG
AACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGGAUUACAAGGAAGUCA	AAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGA	AAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAAGAACUGCAGAAGGGAAACGAA
ACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUU	UACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAGUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCC	CAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACCAACCUGGGAGCCACCGGCAGCA	CAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGU	GAGCCAGCUGGGGAGGAGACUAG

【表１６】

UGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUC	
CUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAG	
UACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA	
CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAG	
CUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAG	
GCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACAAC	
GGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGAC	
GCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCA	
GACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACACAGAAAUCACA	
AAGGCACCGCUGAAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUC	
AGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCGCAGGAUACAUCGACGGA	
GGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC	
AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGA	
GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC	
CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGC	
GAAGAAACAAUCACACCGUGGAAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUG	
ACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC	
AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA	
AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAA	
UGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGGACAUACCACGACCUGCUGAAG	
AUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUG	
UUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUG	
AAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAA	
GACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGAC	
AUUCAAGGAAGACAUCCAGAAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAACCUGGGCAGG	
AAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAA	
GCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAGAAAAGAAU	
GAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA	
GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACU	
GAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAG	
AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA	
GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACU	
GGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAG	
CAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGU	
CAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCU	

10

20

30

40

50

【表１７】

	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGGAACACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAG
	GUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUG
	UUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAUACACAAGAAAGAAGAACAGA
	AUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGC
	UUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAA
	AAGUACCCGACACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACUGAGAUCUGAUCUACCUG
	GCACUGGCACACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGAC
	AAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCA
	AAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAG
	AACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAA
504	GACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUAC
	GCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGAGUCAACACACAGAAAUC
	ACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGAAGGCACUG
	GUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGAC
	GGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUG
	GUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUG
	GGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAG
	AUCCUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAG
	AGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGA
	AUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUC

【表１８】

UACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAG
GCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUC
GAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUG
AAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACA
CUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAG
CUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGG
AAAGACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUUCGCAAACAGAAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCU
GACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACACAUCGCAAACCUGGC
AGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACA
CAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAG
AAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCU
GCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG
ACUGAGCGACUACGUCGACCACACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAAGCAUCGACAACAAGGUCCUGAC
AAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAG
ACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGGAGGACUGAGCGA
ACUGGACAAGGCAGGAUUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGA
CAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCACUCACACUGAAGAGCAAGCU
GGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACGCACACGACGCAUA
CCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAA
GGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUACUCAG
CAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAA
CGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGU
CAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAA
GCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCU
GGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGA
AAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAU
CAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAGAAAGAGAUGCUGGCAAGCGCAGGAAGAACUGCAGAA
GGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAG
CCCGGAAGACAACGAAGCAGAAGCAGCUGUUUCGUCGAACACAGCACAAGGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAG
CGAAUUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAAACAUCAUCCACCUGACCCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUA
GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUA
CUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAU
CACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAAA
GGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGGUCGACAGCGGAUAG

10

20

30

40

50

【表１９】

505	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUC
	CCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUC
	GACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACACAAGAAAGAACAGAAUC
	UGCUACCUGCAGGAAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACACAGCUUCUUCCACACAGACUGGAAGAAAGCUUC
	CUGGUCGAAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGAACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAG
	UACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCA
	CUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAG
	CUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAG
	GCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCCAGCUGCCGGGAGAAAGAAGAACGAAC
	GGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGAC
	GCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCA
	GACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACA
	AAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUC
	AGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGA
	GGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUC
	AAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGAUCCACCUGGGA
	GAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUC
	CUGACAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGC
	GAAGAAACAAUCACACCGUGGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUG
	ACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC
	AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA
	AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAA
	UGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCUGCUGAAG
	AUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUG
	UUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUG
	AAGAGAAGAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGGAGCGGAAA
	GACAAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGAC
	AUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGG
	AAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAUGGGAAGACACAA
	GCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAGAAU
	GAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCA
	GAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACU
	GAGCGACUACGUCGACCACACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAG
	AAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACA
	GCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGGACUGAGCGAACUU

10

20

30

40

50

【表２０】

	GGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAG
	CAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGU
	CAGCGACUUCAGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCU
	GAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGU
	CUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUACUCAGCAA
	CAUCAUGAACUUCUUCAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG
	AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAA
	CAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCU
	GAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGU
	CGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAAUCACAAUCAUGGAAAG
	AAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAA
	GCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGG
	AAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCC
	GGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGA
	AUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC
	GAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUU
	CGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCAC
	AGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCCCGAAGAAGAGAAAGGU
	CGACGGAAGCCCGAAGAAGAAAGGUCGACAGCGGA
506	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGACAAGAAG
	TACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAA
	GTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGAGAAA
	CAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGA
	AATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACA
	AGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCAC
	CTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTT
	CAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGA
	CATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC
	AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCCAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCAC
	TGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACA
	TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAG
	CGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGA
	GATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATC
	TTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAA
	GCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGA

【表２１】

	ACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTA
	CCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAA
	GAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGA
	CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGA
	AGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAG
	CCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCA
	GCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAA
	GCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTG
	GAAGACATCGTCCTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAAGCTGAAGACATACGCACACCTGTT
	CGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGA
	ATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGAAGTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAAACTTCATGCAGCT
	GATCCACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCCAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAA
	CACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAA
	GGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACACAACACAGAAGGGACAGAAG
	AACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAGAATCGAAGGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCG
	AAAACACACAGCTGCAGAACGAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTG
	GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAA
	GGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAC
	TACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGAC
	TGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACACAAAGCACGTCGCACAGATC
	CTGGACAGCAGAATGAACACACAAAGTACGACGAAAACGACACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCA
	AGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACGCCCACGACGCA
	TACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAA
	GGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCA
	ACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA
	GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACAT
	CGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATC
	GCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGC
	AAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAAATCACACAATCATGGAAAGAAGCAGC
	TTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAA
	GTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAGAAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTG
	GCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACCG
	ACAGAAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAAATCAGCGAATTCAGCAAGAGAG
	TCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGC
	AGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA

10

20

30

40

50

【表２２】

	GAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG
	AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTT
	AAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGG
	TGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAT
	GGAAAGAACCTCGAG
507	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT
	CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCG
	ACAGCGGAGAAACAGCAAGAAGACTGAAGAGAAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCT
	GCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCggCTGGAAGAAAGCTTCCTGGT
	CGAAGAAGACAAGAAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCG
	ACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACA
	CATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCC
	AGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGC
	GCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAAACCTGATCGCCACAGCTGCCGGGAGAAAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAA
	ACCTGATCGCCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTG
	AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCCTGGCAGC
	AAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAA
	GCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAG
	TACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTA
	CAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGA
	GAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACA
	GGAAGACTTCTACCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCG
	GACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGA
	AGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAA
	AAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGA
	AGGAATGAGAAAGCCGGCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAG
	GTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGA
	CAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAA
	ACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACA
	TACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAA
	AGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAG
	AAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAG
	ACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTC
	GACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACAC
	AGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGA

10

20

30

40

50

【表２３】

	AGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTAC
	GTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGA
	CAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTC
	AAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGG
	CAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA
	GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTC
	ATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCA
	CCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCG
	TCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAAAGAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAA
	GTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCT
	GATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGC
	ATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAAGAAGGAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAA
	ACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATA
	CAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA
	ATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACC
	TGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTG
	CAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGG
	AAGCCCGGAAGACAACGAAGAGCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCA
	GCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAG
	CCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTT
	CGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACA
	GGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGGACGGAGGAAGCCCGAAGAAGAGAAAGGTCT
	AG
508	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCG
	ACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCGAAGAAGAAAGAATACACCAGAAGAACAGAATCTG
	CTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGT
	GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
	ACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCCA
	CATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCA
	GCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCG
	CCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAA
	CCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAG
	CAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCA
	AGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGC

10

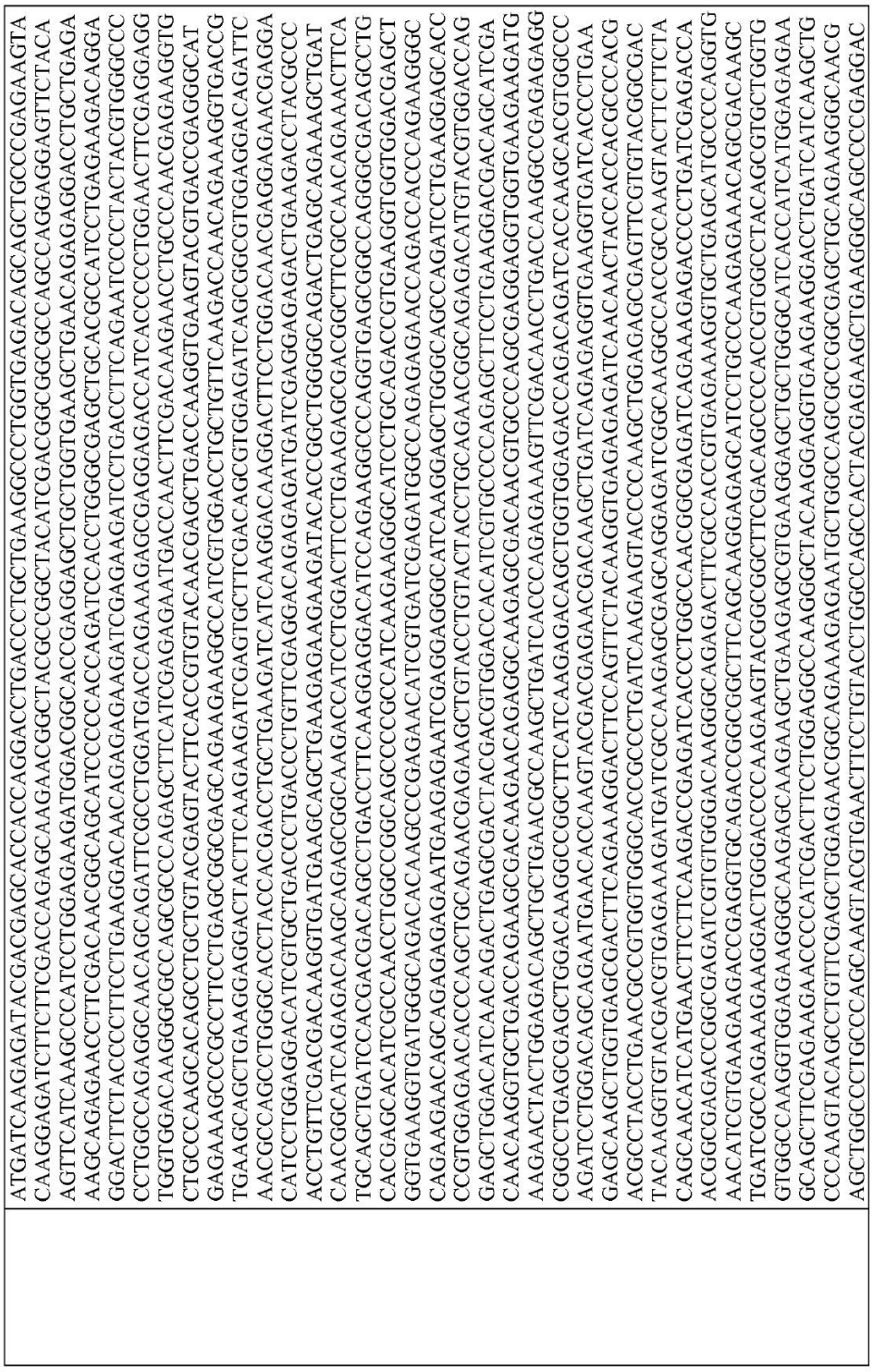
20

30

40

50

【表２４】


ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTA
CAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACA
AGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGA
AAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGA
GGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCC
CCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGG
TGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTG
CTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCAT
GAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCG
TGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGGACAGATTC
AACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGA
CATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCC
ACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGAT
CAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTG
CACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCT
GGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGC
CAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACC
CCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAG
GAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGA
CAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATG
AAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGG
CGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCC
AGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAA
GAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCACGCCCACG
ACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGAC
TACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTA
CAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCA
ACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTG
AACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGC
TGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTG
GTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAA
GCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTG
CCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACG
AGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGAC

【表２５】

509	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGAC
	AAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAG
	CAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGACAGCG
	GCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAACAGAATCTGCTACCT
	GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGG
	AGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATC
	TACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGAT
	CAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGT
	GCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGAC
	TGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATC
	GCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA
	CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCT
	GAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCA
	AGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGA
	GATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCAT
	CAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAG
	AGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTT
	CTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAAGATCGAGAAAGAGGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGC
	CAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGG
	ACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCC
	AAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAA
	GCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGC
	AGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCC
	AGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT
	GGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGT
	TCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG
	CATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAGC
	TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAG
	CACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAA
	GGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAG

10

20

30

40

50

【表２６】

	AACAGCAGAGAGAATGAAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGG
	AGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTG
	GACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAA
	GGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAC
	TACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCT
	GAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCC
	TGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGCAA
	GCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACTACCACGCCCACGACGCCT
	ACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAG
	GTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAA
	CATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCG
	AGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATC
	GTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCG
	CCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCC
	AAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCT
	TCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAG
	TACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
	CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
	CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGT
	GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGGCAGGCCG
	AGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAA
	AGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATC
	GACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAA
	GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTA
	AAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAATGGA
	AAGAACCTCGAG
510	ATGGACAAGAAGTACTCTATCGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTCGGTTGGGCCGTCATCACCGACGAATACAAGGTC
	CCATCTAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGTAACACCGACAGACACTCTATCAAGAAGAACTTGATCGGTGCCTTGTTGTTCGAC
	TCTGGTGAAACCGCCGAAGCCACCAGATTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAACAGAATCTGCT
	ACTTGCAAGAAATCTTCTCTAACGAAATGGCCAAGGTCGACGACTCTTTCTTCCACAGATTGGAAGAATCTTTCTTGGTCGA
	AGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCAATCTTCGGTAACATCGTCGACGAAGTCGCCTACCACGAAAAGTACCCAACCA
	TCTACCACTTGAGAAAGAAGTTGGTCGACTCTACCGACAAGGCCGACTTGAGATTGATCTACTTGGCCTTGGCCCACATGA
	TCAAGTTCAGAGGTCACTTCTTGATCGAAGGTGACTTGAACCCAGACAACTCTGACGTCGACAAGTTGTTCATCCAATTGGT
	CCAAACCTACAACCAATTGTTCGAAGAAAACCCAATCAACGCCTCTGGTGTCGACGCCAAGGCCATCTTGTCTGCCAGATT
	GTCTAAGAGCAGAAGATTGGAAAACTTGATCGCCCAATTGCCAGGTGAAAAGAAGAACGGTTTGTTCGGTAACTTGATCGC

10

20

30

40

50

【表２７】

CTTGTCTTTGGGTTTGACCCCAAACTTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAGACGCCAAGTTGCAATTGTCTAAGGACACC
TACGACGACGACTTGGACAACTTGTTGGCCCAAATCGGTGACCAATACGCCGACTTGTTCTTGGCCGCCAAGAACTTGTCT
GACGCCATCTTGTCTGACATCTTGAGAGTCAACACCGAAATCACCAAGGCCCCATTGTCTGCCTCTATGATCAAGAGAT
ACGACGAACACCACCAAGACTTGAAGGCCTTGGTCAGACAACAATTGCCAGAAAAGTACAAGGAAATCTTCT
TCGACCAATCTAAGAACGGTTACATCGACGGTGGTGCCTCTCAAGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCAA
TCTTGGAAAAGATGGACGGTACCGAAGAATTGTTGGTCAAGTTGAACAGAGAAGACTTGTTGAGAAAGCAAAGAACCTTC
GACAACGGTTCTATCCCACACCAAATCCACTTGGGTGAATTGCACGCCATCTTGAGAAGACACAAGAAGACTTCTACCCATTC
TTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCTTGACCTTCAGAATCCCATACTACGTCGGTCCATTGGCCAGAGGTAA
CAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGTCTGAAGAAACCATCACCCCATGGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGTG
CCTCTGCCCAATCTTTCATCGAAAGAATGACCAACTTCGACAAGAACTTGCCAAACGAAAAGGTCTTGCCAAAGCACTCTT
TGTTGTACGAATACTTCACCGTCTACAACGAATTGACCAAGGTCACGTACGTCACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCTTCT
TGTCTGGTGAACAAAAGAAGGCCATCGTCGACTTGTTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTCACCGTCAAGCAATTGAAGGAA
GACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACTCTGTCGAAATCTCTGGTGTCGAAGACAGATTCAACGCCTCTTTGGGTACCT
ACCACGACTTGTTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCTTGGAAGACATCGTC
TTGACCTTGACCTTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAATTGAAGACCTACGCCCACTTGTTCGACGACAAGGTC
ATGAAGCAATTGAAGAGAAGAAGATACACCGGTTGGGTAGATTGAGCAGAAAGTTGATCAGAGACAAGC
AATCTGGTAAGACCATCTTGGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTTCGCCAACAGAAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACTC
TTTGACCTTCAAGGAAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTTTGCACGAACACATCGCCAACTTGGC
CGGTTCTCCAGCCATCAAGAAGGGTATCTTGCAAACCGTCAAGGTCGTCGACGAATTGGTCAAGGTCATGGGTAGACACAA
GCCAGAAAACATCGTCATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAACCACCCAAAAGGGTCAAAAGAACAGCAGAGAAAGAATG
AAGAGAATCGAAGAAGGTATCAAGGAATTGGGTTCTCAAATCTTGAAGGAACACCCAGTCGAAAACACCCAATTGCAAAA
CGAAAAGTTGTACTTGTACTACTTGCAAAACGGTAGAGACATGTACGTCGACCAAGAATTGGACATCAACAGATTGTCTGA
CTACGACGTCGACCACATCGTCCCACAATCTTTCTTGAAGGACGACTCTATCGACAACAAGGTCTTGACCAGATCTGACAA
GAACAGAGGTAAGTCTGACAACGTCCCATCTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAATTGTTGAACG
CCAAGTTGATCACCCAAAGAAAGTTCGACAACTTGACCAAGGCCGAAAGAGGTGGTTTGTCTGAATTGGACAAGGCCGGT
TTCATCAAGAGACAATTGGTCGAAACCAGACAAATCACCAAGCACGTCGCCCAAATCTTGGACAGCAGAATGAACACCAA
GTACGACGAAAACGACAAGTTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACCTTGAAGTTGGTCTCTGACTTCAGAAAGG
ACTTCCAATTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACTTGAACGCCGTCGTCGGTACCG
CCTTGATCAAGAAGTACCCAAAGTTGGAATCTGAATTCGTCTACGGTGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCG
CCAAGTCTGAACAAGAAATCGGTAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCTAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAAA
TCACCTTGGCCAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACCAACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAG
GGTAGAGACTTCGCCACCGTCAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAGTCAACATCGTCAAGAAGACCGAAGTCCAAACCGGT
GGTTTCTCTAAGGAATCTATCTTGCCAAAGAGAAACTCTGACAAGTTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCAAAGAA
GTACGGTGGTTTCGACTCTCCAACCGTCGCCTACTCTGTCTTGGTCGTCGCCAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAGTT
GAAGTCTGTCAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGGAAAAGAGATCTTCTTTCGAAAAGAACCCAATCGACTTCTTGGAAGC

10

20

30

40

50

【表２８】

	CAAGGGTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACTTGATCATCAAGTTGCCAAAGTACTCTTTGTTCGAATTGGAAAACGGTAGAA
	AGAGAATGTTGGCCTCTGCCGGTGAATTGCAAAAGGGTAACGAATTGGCCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTACTT
	GGCCTCTCACTACGAAAAGTTGAAGGGTTCTCCAGAAGACAACGAACAAAAGCAATTGTTCGTCGAACAACACAAGCACT
	ACTTGGACGAAATCATCGAACAAATCTCTGAATTCTCTAAGAGAGTCATCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAGGTCTTGT
	CTGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCAATCAGAGAACAAGCCGAAAACATCATCCACTTGTTCACCTTGACCAACTTG
	GGTGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCTCTACCAAGGAAGTCTTGGACGCC
	ACCTTGATCCACCAATCTATCACCGGTTTGTACGAAACCAGAATCGACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACGGTGGTTCTC
	CAAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA
511	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGA
	CTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCT
	ACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGG
	AGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACC
	ATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATG
	ATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTG
	GTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGG
	CTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGAT
	CGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGA
	CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCT
	GTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAA
	GCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGA
	TCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCA
	AGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCG
	GACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTA
	CCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCG
	GGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACA
	AGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG
	CACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCC
	GCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCT
	GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCT
	GGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGG
	ACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACG
	ACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGG
	GACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCAC
	GACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGC

【表２９】

	CAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG
	GCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCG
	GGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACC
	CAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAA
	CCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGAC
	CCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGC
	AGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTG
	GACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACTCCCG
	GATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCG
	ACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCG
	TGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGC
	GGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCT
	TCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGCCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATC
	GTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGA
	GGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACT
	GGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGC
	AAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCAT
	CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCT
	GGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTCCCAAGTACG
	TGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGG
	AGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAAC
	CTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTT
	CACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAA
	GGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGG
	CGACGGCGGCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
512	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCG
	ACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTG
	CTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGT
	GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
	CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAC
	ATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAG
	CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGC
	CCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCC
	TGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCA

【表３０】

AGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAG
AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCAT
GATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCTGCCCGAGAAGTACA
AGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGGAGGAGTTCTACAAG
TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAA
GCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGG
ACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCC
TGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAGGTG
GTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT
GCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGC
GGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTG
AAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA
CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACA
TCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCAC
CTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGCTGAGCCGGAAGCTGATCAA
CGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGC
AGCTGATCCACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCAC
GAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGT
GAAGGTGATGGGCCGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG
TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAG
CTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA
CAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAG
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG
CCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGA
TCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGC
AAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACGCCCACGACGC
CTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACA
AGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGC
AACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAAGATCCGGCCCCTGATCGAGACCAACGG
CGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACA
TCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATC
GCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGC
CAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA

【表３１】

513	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCGA
	CTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCT
	ACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCCTGGTGG
	AGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACC
	ATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATG
	ATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACTCCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTG
	GTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGG
	CTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGAT
	CGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGA
	CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAGAACCT
	GTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAA
	GCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGA
	TCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCA
	AGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCG
	GACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTA
	CCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCG
	GGGCAACTCCCGGTTCGCCTGGATGACCGGAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACA
	AGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAG
	CACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCC
	GCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCT
	GAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCT
	GGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGG
	ACATCGTGCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACG
	ACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGG
	GACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCAC
	GACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGC
	CAACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG

10

20

30

40

50

【表３２】

514	GCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCG
	GGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACC
	CAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAA
	CCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGAC
	CCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGC
	AGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTG
	GACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACTCCCG
	GATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCG
	ACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCG
	TGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGC
	GGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCT
	TCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATC
	GTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGA
	GGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACT
	GGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCCACCGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGC
	AAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCAT
	CGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCT
	GGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACG
	TGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGG
	AGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAAC
	CTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTT
	CACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAA
	GGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGG
	CGACGGCTCCGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACTCCGGCTGA
	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCG
	ACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGAAGAACCGGATCTG
	CTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGT
	GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
	CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAC
	ATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAG
	CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGC
	CCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACC
	TGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCA
	AGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCCGCCAAG

10

20

30

40

50

【表３３】

AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCAT	
GATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACA	
AGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAG	
TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAA	
GCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGG	
ACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCC	
TGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTG	
GTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT	
GCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGC	
GGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTG	
AAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA	
CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACA	
TCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCAC	
CTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAA	
CGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGC	
AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCAC	
GAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGT	
GAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG	
AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG	
TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAG	
CTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA	
CAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAG	
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG	
CCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGA	
TCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGC	
AAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGC	
CTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACA	
AGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGC	
AACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGCCCCCTGATCGAGACCAACGG	
CGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACA	
TCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATC	
GCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGC	
CAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC	
TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA	
GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG	

10

20

30

40

50

【表３４】

515	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT
	GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTCG
	ACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTG
	CTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGAGCTTCCTGGT
	GGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
	CCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCAC
	ATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTCATCCAG
	CTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGC
	CCGGCTGAGCAAGAGCCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCC
	TGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCA
	AGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCTGGCCGCCAAG
	AACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCAT
	GATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCGAGAAGTACA
	AGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAG
	TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAA
	GCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGG
	ACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCC
	TGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAGGTG
	GTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCT
	GCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGC
	GGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTG
	AAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA
	CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACA
	TCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCAC
	CTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAA
	CGGCATCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGC
	AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCAC
	GAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGT

10

20

30

40

50

【表３５】

	GAAGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
	AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCG
	TGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAG
	CTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA
	CAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAG
	AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGG
	CCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGA
	TCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCCTGAAGAGC
	AAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGC
	CTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACA
	AGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGC
	AACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCCTGATCGAGACCAACGG
	CGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACA
	TCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATC
	GCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGC
	CAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGC
	TTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAA
	GTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGG
	CCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG
	CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGT
	GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCG
	AGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGA
	AGCGGTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATC
	GACCTGAGCCAGCTGGGCGGCGACTGA
516	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCG
	GCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA
	CCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCU
	GAAGCGGACCGCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUCCAACGAGAU
	GGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCA
	CCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCCACCAUCUACCACCUGCGGAAGAAGCUG
	GUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUGGCCCACAUGAUCAAGUUCCGGGGCCACUUCC
	UGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGC
	UGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCG
	GCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAACCUGAUCGCCCUGUCCCUGGGCC
	CUGACCCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGAC

10

20

30

40

50

【表３６】

ACCUGGACAACCUGCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUGUUCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAU	
CCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGAC	
GAGCACCACCAGGACCUGACCCUGAAGGCCCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUC	
GACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCA	
UCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCU	
UCGACAACGGCUCCAUCCCCCACCAGAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGCGGCAGGAGGACUUCUACCC	
CUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGGCCCCUGGCCCGG	
GGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGAC	
AAGGGCGCCUCCGCCCAGUCCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCA	
AGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGA	
AGCCCGCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGA	
AGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCA	
ACGCCUCCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGG	
ACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACG	
CCCACCUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCCGGCUGUCCCGGAAGC	
UGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGA	
ACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCG	
ACUCCCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGU	
GGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCAC	
CCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAGAUCCU	
GAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAU	
GUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUCCUUCCUGAA	
GGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGCCUCCGAGGA	
GGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCU	
GACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGCUGGUGGAGACCCGGCA	
GAUCACCAAGCACGUGGCCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGA	
GGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAU	
CAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUG	
GAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCGGC	
AAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCUGGCCAACGGCGAGA	
UCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCG	
UGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGU	
CCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCG	
ACUCCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGA	
AGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGGGCU	

10

20

30

40

50

【表３７】

	ACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGA
	UGCUGGCCUCCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCCUGCCCUCCCAAGUACGUGAACUUCCUGUACCUGGC
	CUCCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCCGAGGACAACGAGCAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUA
	CCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCU
	GUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAAC
	CUGGGCGCCCCCGCCUUCAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGG
	ACGCCACCCUGAUCCACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGACGGCGG
	CGGCUCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGGACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUA
	AUACCAACUUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUC
	UUCACAUUCUCUCGAG

【０５７４】

１．２　ヒトＫＬＫＢ１ガイド設計およびカニクイザル相同性ガイド設計を有するヒトＫＬＫＢ１

ガイドＲＮＡを、エクソン１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、および１５内のタンパク質コード領域を標的とするヒトＫＬＫＢ１（ＥＮＳＧ００００００１６４３４４）に対して設計した。また、ガイドＲＮＡを、エクソン１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、および１５内のタンパク質コード領域を標的とするカニクイザルＫＬＫＢ１（ＥＮＳＭＦＡＴ０００００００２３５５）に対して設計した。ガイドＲＮＡおよび対応する標的ゲノム座標を上に提供する

（表１）。

【０５７５】

１．２．Ｃａｓ９（ｍＲＮＡ／タンパク質）およびインビトロでのガイドＲＮＡ送達

１．２．１．細胞調製、インビトロでの送達

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）（Ｇｉｂｃｏ、ロットＨｕ８２９６、Ｈｕ８３００、およびＨｕ８２８４、Ｈｕ８２９６、ＨＵ８２９０、およびＨＵ８３１７）ならびに初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）（Ｇｉｂｃｏ、ロットＣｙ３６７、Ｃｙ４００、および１０２８１０１１）を解凍し、サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号ＣＭ７５００）を含む肝細胞解凍培地に再懸濁させ、次いで、遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を、デキサメタゾンを含む肝細胞プレーティング培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ Ｅ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ａ１２１７６０１）＋カクテルサプリメント、ＦＢＳ含有量、およびプレーティングサプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号ＣＭ３０００）で再懸濁させた。細胞を計数し、ＰＨＨについては３０，０００～３５，０００細胞／ウェル、ＰＣＨについては４０，０００～４５，０００細胞／ウェルの密度でＢｉｏ－ｃｏａｔ ｃｏｌｌａｇｅｎ Ｉでコーティングした９６ウェルプレート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号８７７２７２）上にプレーティングした。プレーティングした細胞を、３７℃および５％CO_2雰囲気での組織培養インキュベーター中で４～６時間放置し、接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について確認し、肝細胞維持培地（維持サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号ＣＭ４０００）を有するＷｉｌｌｉａｍ’ｓ Ｅ Ｍｅｄｉｕｍ））またはＣｅｌｌａｒｔｉｓ Ｐｏｗｅｒ Ｐｒｉｍａｒｙ ＨＥＰ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）で１回洗浄した。

【０５７６】

ＫＬＫＢ１を標的とするガイドＲＮＡを、例えば、Ｃａｓ９タンパク質を有するリポソーム系を使用して、または以下にさらに記載するように、Ｃａｓ９ ｍＲＮＡおよびガイドＲＮＡを含むＬＮＰ製剤を使用して、細胞に送達した。

【０５７７】

１．２．２．ＲＮＰトランスフェクション

リポソーム系（Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、カタログ番号１３７７８１５０）およびＣＲＩＳＰＲ試薬（ガイドＲＮＡ、Ｃａｓ９タンパク質）とともにＲＮＰトランスフェクションを使用して、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を細胞膜にシャトルした。

【０５７８】

デュアルガイド（ｄｇＲＮＡ）を利用した試験のために、個々のｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを、等量の試薬を混合し、９５℃で２分間インキュベートし、室温まで冷却することによって、予めアニーリングしておいた。予めアニーリングしたｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡからなるｇＲＮＡを反応緩衝液（ＯｐｔｉＭｅｍ）中のＳｐｙ Ｃａｓ９タンパク質に添加してＲＮＰ複合体を形成し、形成されたＲＮＰ複合体を室温で１０分間インキュベートした。ＲＮＰ複合体をＯｐｔｉＭｅｍで希釈し、１μｍのＲＮＰ複合体原液を調製した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸおよびＯｐｔｉＭｅｍを含むトランスフェクション混合物を調製し、少なくとも５分間インキュベートした。トランスフェクション混合物をＲＮＰ複合体に加え、室温で１０分間インキュベートし、トランスフェクション剤（トランスフェクション混合物およびＲＮＰ複合体）を細胞に加えた。Ｓｐｙ Ｃａｓ９タンパク質（１０ｎＭ）、個々のガイド／トレーサーＲＮＡ（１０ｎＭ）、およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ＲＮＡｉＭＡＸ（１．０μＬ／ウェル）およびＯｐｔｉＭｅｍを含有するＲＮＰ複合体によって、細胞をトランスフェクトした。

【０５７９】

１．２．３．ＲＮＰエレクトロポレーション

ＲＮＰエレクトロポレーションを、細胞エレクトロポレーションシステム（Ｌｏｎｚａ ４Ｄ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（商標）キット８１６Ｂ０３４６）およびＣＲＩＳＰＲ

試薬、ｇＲＮＡおよびＣａｓ９タンパク質とともに使用して、リボ核タンパク質（ＲＮＰ）複合体を細胞膜にシャトルした。

【０５８０】

ｄｇＲＮＡを利用した試験のために、個々のｃｒＲＮＡおよびｔｒＲＮＡを、等量の試薬を混合し、９５℃で２分間インキュベートし、室温まで冷却することによって、予めアニーリングしておいた。

【０５８１】

ｓｇＲＮＡを利用する試験のために、水に対して等量の１００ｕＭ　ｓｇＲＮＡを９５℃で２分間インキュベートし、続いて氷上で５分間冷却することによって、５０ｕＭのｓｇＲＮＡ原液を調製した。ｓｇＲＮＡを反応緩衝液（２０ｍＭのＨｅｐｅｓ、１００ｍＭのＫＣｌ、１ｍＭのＭｇＣｌ２、１０％のグリセロール、１ｍＭのＤＴＴ　ｐＨ７．５）中のＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質に加え、ＲＮＰ複合体を形成し、室温で１０分間インキュベートした。細胞を、Ｓｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質（２ｕＭ）およびｇＲＮＡ（４ｕＭ）およびＬｏｎｚａ　Ｐ３緩衝液（カタログ番号Ｖ４ＳＰ－３９６０）を含有するＲＮＰ複合体でエレクトロポレーション（Ａｍａｘａ（商標）９６ウェルＳｈｕｔｔｌｅ（商標）カタログ番号ＡＡＭ－１００１Ｓ）。エレクトロポレーション後、肝細胞プレーティング培地（Ｗｉｌｌ’ｓ　Ｅ、カタログ番号Ａ１２１７６－０１）を細胞プレートに加え、細胞を含む培地をコラーゲンコーティングしたプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　３５４４０７）に移した。４～６時間後、３７℃一晩インキュベーションするために、培地を維持培地（Ｗｉｌｌｉａｍ’ｓ　Ｅ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ１２１７６－０１、ロット２０３９７３３）および維持サプリメント（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号Ａ１２１７６－０１、ロット２０３９７３３）に交換した。

【０５８２】

１．２．４．ｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有するＬＮＰ製剤の調製

一般に、脂質ナノ粒子の構成要素を、様々なモル比で、１００％エタノールに溶解した。ＲＮＡカーゴ（例えば、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡ）を２５ｍＭのクエン酸塩、１００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５．０）に溶解して、約０．４５ｍｇ／ｍＬのＲＮＡカーゴ濃度を得た。実施例２－１０で使用されるＬＮＰは、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）とも称される、イオン化可能な液体（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で含んでいた。約６の脂質アミンとＲＮＡホスフェートとの（Ｎ：Ｐ）モル比、および１：２のｇＲＮＡとｍＲＮＡとの重量比で、ＬＮＰを製剤化した。実施例２～１０で使用したＬＮＰは、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡを含む。

【０５８３】

クロスフロー技術を使用し、エタノール中の脂質を２体積のＲＮＡ溶液および１体積の水と衝突噴流混合することによって、ＬＮＰを調製した。エタノール中の脂質を、混合交差部（ｍｉｘｉｎｇ　ｃｒｏｓｓ）により、２体積のＲＮＡ溶液と混合した。第４の水の流れを、ライン内のティーを通る交差部の出口流と混合した（ＷＯ２０１６／０１０８４０の図２を参照）。ＬＮＰを室温で１時間保持し、さらに水で希釈した（およそ１：１　ｖ／ｖ）。希釈したＬＮＰを、フラットシートカートリッジ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ、１００ｋＤ　ＭＷＣＯ）でタンジェンシャルフロー濾過を用いて濃縮し、次いで、ＰＤ－１０脱塩カラム（ＧＥ）を用い、緩衝液を５０ｍＭのＴｒｉｓ、４５ｍＭのＮａＣｌ、５％（ｗ／ｖ）のスクロース、ｐＨ７．５（ＴＳＳ）に交換した。次いで、得られた混合物を０．２μｍの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終ＬＮＰを、カプセル化効率、多分散指数、および平均粒径を決定するために特性決定した。最終ＬＮＰを、さらなる使用まで４℃または－８０℃で保存した。

【０５８４】
１．２．５．ｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９　ｍＲＮＡリポフェクション
Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡのリポフェクションは、予め混合された脂質製剤を使用した。リポフェクション試薬は、３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピル（９Ｚ，１２Ｚ）－オクタデカ－９，１２－ジエノエート）とも称される、イオン化可能な液体（（９Ｚ，１２Ｚ）－３－（（４，４－ビス（オクチルオキシ）ブタノイル）オキシ）－２－（（（（３－（ジエチルアミノ）プロポキシ）カルボニル）オキシ）メチル）プロピルオクタデカ－９，１２－ジエノエート、コレステロール、ＤＳＰＣ、およびＰＥＧ２ｋ－ＤＭＧをそれぞれ５０：３８：９：３のモル比で含んでいた。次いで、混合物を１００％エタノールで再構成し、次いで、約６．０の脂質アミン対ＲＮＡリン酸塩（Ｎ：Ｐ）モル比で、ＲＮＡカーゴ（例えばＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｇＲＮＡ）と混合した。ガイドＲＮＡを、商用ベンダーにより、または修飾ヌクレオチドを用いた標準的なインビトロ合成技術を使用して、化学的に合成した。２時間のＩＶＴ反応時間を使用し、ＬｉＣｌ沈殿、続いてタンジェンシャルフロー濾過によってｍＲＮＡを精製することにより、ＷＯ２０１９／０６７９１０（例えば、段落［００３５４］を参照）に記載されるようなＩＶＴにより、表５のＣａｓ９　ＯＲＦを生成した。リポフェクションを、３％カニクイザル血清を使用して、１：１のｇＲＮＡとｍＲＮＡとの重量比で行った。
【０５８５】
１．２．６．ＬＮＰトランスフェクション
ヒトＫＬＫＢ１を標的とする修飾ｓｇＲＮＡを、実施例１に記載されるようにＬＮＰ中に製剤化した。初代ヒト肝細胞を、実施例１に記載されるようにプレーティングした。ＬＮＰで治療する前に、細胞を３７℃、５％ＣＯ２で４８時間インキュベートした。ＬＮＰを、３％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む培地で３７℃で１０分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞から培地を吸引し、３％ＦＢＳおよびＬＮＰを有する培地の混合物を肝細胞に添加した。トランスフェクション後７２～９６時間で、細胞の一部を収集し、実施例１に記載されるようにＮＧＳシークエンシングのために処理した。
【０５８６】
１．３．ゲノムＤＮＡ単離
トランスフェクトしたＰＨＨおよびＰＣＨを、トランスフェクトから４８時間後または７２時間後に採取した。ｇＤＮＡを、９６ウェルプレートの各ウェルから、５０μＬ／ウェルのＢｕｃｃａｌＡｍｐ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ溶液（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ、カタログ番号ＱＥ０９０５０）またはＺｙｍｏ’ｓ　Ｑｕｉｃｋ　ＲＮＡ／ＤＮＡ抽出キット（カタログ番号Ｒ２１３０）を使用して、製造業者のプロトコルに従って抽出した。全てのＤＮＡ試料に対し、本明細書に記載されるように、ＰＣＲおよびその後のＮＧＳ分析を行った。
【０５８７】
１．４．次世代シークエンシング（「ＮＧＳ」）およびオンターゲット切断効率の分析
ゲノム中の標的位置における編集効率を定量的に決定するために、次世代シーケンシングを使用して、遺伝子編集によって導入された挿入および欠失の存在を特定した。目的の遺伝子（例えば、ＫＬＫＢ１）内の標的部位周辺でＰＣＲプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅させた。プライマー配列設計は、現場で標準として行われた。
【０５８８】
シークエンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）に従って追加のＰＣＲを実施した。アンプリコンをＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ装置でシークエンシングした。低品質スコアを有するものを除外した後に、リードをヒト（例えばｈｇ３８）参照ゲノムとアラインメントした。得られたリードを含むファイルを、参照ゲノム（ＢＡＭファイル）にマッピングし、目的の標的領域と重なり合うリードを選択し、挿入または欠失（「インデル」）を含有するリードの数に対する、野生型リードの数を計算した。

【０５８９】
編集割合（例えば、「編集効率」または「編集率」）は、野生型を含む配列読み取りの総数に対する、挿入または欠失（「インデル」）を含む配列読み取りの総数であると定義される。
【０５９０】
生化学的方法（例えば、Ｃａｍｅｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ．６、６００－６０６；２０１７を参照）を使用して、ＫＬＫＢ１を標的とするＣａｓ９によって切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を発見した。細胞からの精製されたゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）を、Ｃａｓ９およびｓｇＲＮＡのインビトロで組み立てられたリボ核タンパク質（ＲＮＰ）で消化し、オンターゲット部位およびｓｇＲＮＡスペーサー配列と相同性を有する潜在的なオフターゲット部位におけるＤＮＡ切断を誘導した。ｇＤＮＡ消化後、遊離ｇＤＮＡ断片末端をアダプターでライゲーションして、編集断片の濃縮およびＮＧＳライブラリー構築を促進した。ＮＧＳライブラリーを配列決定し、バイオインフォマティクス分析を通じて、リードを分析して、遊離ＤＮＡ末端のゲノム座標を決定した。次いで、リードの蓄積を有するヒトゲノム中の位置を、潜在的なオフターゲット部位としてアノテーションした。
【０５９１】
上で使用される生化学アッセイ等の既知のオフターゲット検出アッセイでは、多数の潜在的なオフターゲット部位が、典型的には、設計によって回収され、他の状況、例えば目的の一次細胞において検証することができる潜在的な部位に対して「ワイドネットをキャストする」ようにする。例えば、この生化学アッセイは、典型的には、このアッセイが細胞環境を含まない精製された高分子量ゲノムＤＮＡを利用し、使用されるＣａｓ９ ＲＮＰの用量に依存するため、潜在的なオフターゲット部位の数を過剰に表す。したがって、これらのアッセイによって特定された潜在的なオフターゲット部位は、特定された潜在的なオフターゲット部位の標的化シークエンシングを使用して検証された。
【０５９２】
標的シークエンシングに対する１つのアプローチでは、Ｃａｓ９および目的のｓｇＲＮＡ（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するｓｇＲＮＡ）を、ＰＨＨまたはＰＣＨ細胞に導入した。次いで、細胞を溶解し、潜在的なオフターゲット部位に隣接するプライマーを使用してＮＧＳ分析のためのアンプリコンを生成する。特定のレベルでのインデルの特定を使用して、潜在的なオフターゲット部位を検証することができるが、潜在的なオフターゲット部位で見出されるインデルの欠如は、利用されたオフターゲットアッセイにおいて偽陽性を示す場合がある。
【０５９３】
標的インデル活性を示すガイドを、このアッセイで潜在的なオフターゲットゲノム切断部位について試験した。修復構造を、修復構造を検証するために、オフターゲット切断部位で統計的に関連するインデル率を有する遺伝子座で手動で検査した。
【０５９４】
１．５ 定量ＰＣＲによる転写産物分析
ＫＬＫＢ１転写産物レベルを評価するために定量ＰＣＲを行った。ｍＲＮＡを単離するために、Ｑｉａｇｅｎ ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号７４１０６）を使用した。製造者のプロトコルに従って、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔの手順を完了した。
【０５９５】
ＲＮＡを、Ｎａｎｏｄｒｏｐ ８０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＮＤ－８０００－ＧＬ）を使用して定量化した。製造者のプロトコルに従って、ＲＮＡ定量化の手順を完了した。使用前に、ＲＮＡ試料を－２０℃で保存した。
【０５９６】
Ｔａｑｍａｎ ＲＮＡ－ｔｏ－Ｃｔ １－Ｓｔｅｐ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈ

ｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３９２９３８）を使用してＰＣＲ反応物を作製した。製造者のプロトコルに従って、反応の設定を完了した。あるいは、Ｃｅｌｌｓ－ｔｏ－ＣＴ １－Ｓｔｅｐ ＴａｑＭａｎ Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ａ２５６０３）を使用して、ｑＰＣＲのための試料を作製した。ヒトまたはカニクイザルＫＬＫＢ１を標的とする定量的ＰＣＲプローブ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３５１３７２、転写産物ＵｎｉＧｅｎｅ ＩＤ Ｈｓ０１１１１８２８＿ｍ１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３３１１８２、転写産物ＵｎｉＧｅｎｅ ＩＤ Ｈｓ００１６８４７８＿ｍ１）、内部対照ＰＰＩＢ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３５１３７２、転写産物ＵｎｉＧｅｎｅ ＩＤ Ｈｓ００１６８７１９＿ｍ１、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３３１１８２、転写産物ＵｎｉＧｅｎｅ ＩＤ Ｍｆ０２８０２９８５＿ｍ１）、内部対照ＧＡＰＤＨ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３５１３７２、転写産物ＵｎｉＧｅｎｅ ＩＤ Ｈｓ０２７８６６２４＿ｇ１）、および内部対照１８Ｓ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３１９４１３Ｅ）を、ＰＣＲ反応で使用した。製造者のプロトコルに従って、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３７６６００）を使用して、リアルタイムＰＣＲ反応および転写物の定量化を実行した。

【０５９７】

ＫＬＫＢ１ ｍＲＮＡの二重デルタＣｔ分析は、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍから決定されたＣｔ値を用いて提供された。各試料内の内部対照についてのＣｔ値をＫＬＫＢ１の値と比較して、二重デルタＣｔ値を計算した。発現の倍率変化を、各配列についての二重デルタＣｔ値に基づいて決定した。

【０５９８】

１．６．ＥＬＩＳＡによる組織培地のタンパク質分析

ＰＨＨまたはＰＣＨを前述のようにトランスフェクトした。トランスフェクションおよびプレーティング（９６ウェルプレート）後３日目から開始し、２日ごとに細胞上で培地を交換した。トランスフェクションの７～１０日後、培地を細胞から除去し、次いで、１００μＬのＷｉｌｌｉａｍ’ｓ Ｅ培地またはＣｅｌｌａｒｔｉｓ Ｐｏｗｅｒ Ｐｒｉｍａｒｙ ＨＥＰ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）と交換した。２４～４８時間後、培地を採取し、－２０℃で保管した。プレカリクレインおよびカリクレイン（総カリクレインとも呼ばれる）を検出するプレカリクレインＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ２０２４０５）を使用して、総分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを決定した。製造者のプロトコルに従って、キット試薬および標準物を調製した。ＥＬＩＳＡを実行する前に、凍結培地を室温で解凍し、１０００ｒｐｍで１分間遠心分離して、破片をペレット化し、次いで氷上に置いた。ＥＬＩＳＡについて、１０～４０μＬの培地を、Ｓａｍｐｌｅ Ｄｉｌｕｅｎｔ ＮＳアッセイ希釈液で、合計体積が５０ｕｌになるまで希釈した。製造者のプロトコルに従って、ＥＬＩＳＡ手順を完了した。プレートをＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５プレートリーダーで読み取った。総カリクレインレベルを、ＳｏｆｔＭａｘ Ｐｒｏソフトウェアバージョン６．４．２によって、標準曲線の４パラメータロジスティック曲線フィッティングを使用して、計算した。ＫＬＫＢ１試薬で治療した細胞の総分泌プレカリクレインタンパク質の低下は、対照試薬または未治療試料で処理したウェルと比較して決定した。

【０５９９】

１．６．１ ＥＬＩＳＡによる血清のタンパク質分析

以下の手順を使用して、ヒト化マウスにおいて血清プレカリクレインレベルを測定した。投与から６～７日後、動物をイソフロラン麻酔下で心臓穿刺を介した放血によって安楽死させた。血液を血清分離管に収集し、室温で２時間凝固させた後、９０００ｇで１０分間スピンダウンして、血清を分離した。試料を分析まで－２０℃で保管した。

【０６００】
プレカリクレインおよびカリクレイン（総カリクレインとも呼ばれる）を検出するヒトプレカリクレインＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ２０２４０５）を使用して、プレカリクレインタンパク質レベルを決定した。簡潔に述べると、血清を、キット試料希釈液により最終希釈を１：５００倍または１：１０００倍になるように段階希釈した後、ＥＬＩＳＡプレートに加えた。製造者のプロトコルに従って、アッセイを実施した。プレートを、Ｃｌａｒｉｏｓｔａｒプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）で読み取った。血清カリクレインレベルは、標準曲線からの４パラメータロジスティック曲線フィッティングを使用して、Ｍａｒｓソフトウェアによって計算した。ＫＬＫＢ１試薬で治療した細胞の総分泌プレカリクレインタンパク質の低下は、対照試薬または未治療試料で処理したウェルと比較して決定した。

【０６０１】
１．６．２．ウエスタンブロットによるタンパク質分析
ＰＨＨを、以下にさらに記載されるように、表１からの選択ガイドＲＮＡで製剤化したＬＮＰで治療した。ＬＮＰを、３％のＦＢＳまたはカニクイザル血清を含有するＣｅｌｌａｒｔｉｓ　Ｐｏｗｅｒ　Ｐｒｉｍａｒｙ　ＨＥＰ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）中、３７℃で１０分間インキュベートした。インキュベーション後、ＬＮＰを、ヒト肝細胞に添加した。トランスフェクション後３日目から開始し、２日ごとに細胞上で培地を交換した。トランスフェクションの１０～１４日後、９６ウェルプレートにプレーティングした細胞について、培地を除去し、細胞を、５０μＬ／ウェルのＲＩＰＡ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＢＰ－１１５）、ならびに３０，０００～４５，０００個の細胞当たり、完全なプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ、カタログ番号１１６９７４９８００１）、１ｍＭのＤＴＴ、および２５０Ｕ／ｍｌのベンゾナーゼ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号７１２０６－３）からなる新たに添加されたプロテアーゼ阻害剤混合物で溶解した。細胞を氷上で３０分間維持し、そのときに、ＮａＣｌ（１Ｍ最終濃度）を添加した。細胞溶解物を完全に混合し、氷上で３０分間保持した。全細胞抽出物（「ＷＣＥ」）をＰＣＲプレートに移し、遠心分離してペレットデブリにした。Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号５００－０００１）を使用して、溶解物のタンパク質含有量を評価した。製造者のプロトコルに従って、Ｂｒａｄｆｏｒｄアッセイの手順を完了した。使用前に、抽出物を－２０℃で保存した。

【０６０２】
ウエスタンブロットを実施して、ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを評価した。溶解物をＬａｅｍｍｌｉ緩衝液（Ｂｏｓｔｏｎ　ＢｉｏＰｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＢＰ－１１１Ｒ）と混合し、９５℃で１０分間変性させた。ウエスタンブロットを、製造者のプロトコルに従って、４～１２％のＢｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＮＰ０３２３ＢＯＸ）でのＮｕＰａｇｅシステム、その後、０．４５μｍのニトロセルロース膜（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、カタログ番号１６２０１１５）への湿潤状態での移動を使用して、実施した。移した後、膜を水で完全にすすぎ、Ｐｏｎｃｅａｕ　Ｓ溶液（Ｂｏｓｔｏｎ　Ｂｉｏ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、カタログ番号ＳＴ－１８０）で染色し、完全で均一な移動を確認した。ブロットを、室温で、ラボロッカー上で３０分間、ＴＢＳ中の５％の粉ミルクを使用してブロックした。ブロットをＴＢＳＴですすぎ、ＴＢＳＴ中１：１０００でウサギα－カリクレインモノクローナル抗体（Ａｂｃａｍ、カタログ番号ａｂ１２４９３８）でプローブした。インビトロ細胞溶解物を有するブロットについて、ＧＡＰＤＨを、ＴＢＳＴ中１：２５００のローディング対照（Ｎｏｖｕｓ、カタログ番号ＮＢ６００５０２）として使用し、ＫＬＫＢ１一次抗体と同時にインキュベートした。インキュベーション後、ブロットをＴＢＳＴ中で各５分間かけて３回すすいだ。ブロットを可視化し、Ｌｉｃｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙシステムを使用した密度測定計によって分析した。

【０６０３】

１．６．３．血漿カリクレインレベルのエレクトロケミルミネッセンスベース検出

試料中の血漿カリクレインレベルを、ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）によるエレクトロケミルミネッセンス検出プラットフォームを使用するイムノアッセイにより測定した。９６ウェルＭＳＤ標準プレート（カタログ番号Ｌ１５ＸＡ）を、ＰＢＳ中１μｇ／ｍＬの濃度で、２５または４０μＬのカリクレイン用マウスモノクローナル捕捉抗体（ＬＳ－Ｂｉｏ、ＬＳ－Ｃ３８３０８）を用い、４℃で一晩コーティングした。翌日、ウェルを洗浄し、次いで１５０μＬの３％ Ｂｌｏｃｋｅｒ－Ａ（ＭＳＤ、カタログ番号Ｒ９３ＡＡ）を用いてブロックし、室温で１時間、７００ｒｐｍに設定されたシェーカー上でインキュベートした。洗浄後、内部で作製した既知の濃度のヒトカリクレイン標準物質とともに、カリクレイン濃度を決定するための試料をウェルに添加し、７００ｒｐｍに設定したシェーカー上で室温で２時間インキュベートした。試料および標準物質の両方を、１％ブロッカー－Ａ（任意選択で０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含む）で希釈した。

【０６０４】

洗浄後、検出抗体溶液２５μＬを添加し（０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含む１％ブロッカー－Ａ中、ＬＳＢｉｏ番号Ｃ１８５１６８を１ｕｇ／ｍＬで、およびＭＳＤ番号Ｒ３２ＡＧを５００ｕｇ／ｍＬで）、室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、１５０μＬのＭＳＤ金リード緩衝液（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、カタログ番号Ｒ９２ＴＧ）を各ウェルに添加した。ＱｕｉｃｋＰｌｅｘ ＳＱ １２０（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を使用してプレートを読み取った。プレートを、異なるステップの間に０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳで３回洗浄した。

【０６０５】

１．７．血漿カリクレイン活性の蛍光分析

非ヒト霊長類（ＮＨＰ）試料等の試料における総血漿カリクレイン活性レベルを、Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ＳｅｎｓｏＬｙｔｅ Ｒｈ１１０ Ｐｌａｓｍａ Ｋａｌｌｉｋｒｅｉｎ Ａｃｔｉｖｉｔｙ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（Ａｎａｓｐｅｃカタログ番号ＡＳ－７２２５５）を使用して測定した。クロロホルム前処理を実施して、等体積の冷たいクロロホルムを９６ウェルプレート中のＫ２ＥＤＴＡ ＮＨＰ血漿と混合することによって、Ｃ１－阻害剤活性を阻害した。次いで、プレートを４℃、１６，０００×ｇで５分間遠心分離し、１０ｕＬの処理された血漿を最上層から慎重に収集した。９６ウェルの黒色マイクロプレートにおいて、１０ｕＬの前処理された血漿を、３０ｕＬのアッセイ緩衝液、１０ｕＬの血漿プレカリクレイン活性化因子、および５０ｕＬの基質と混合し、これらの全ては、キットで提供され、キットプロトコルに従って調製される。蛍光測定を、励起／発光＝４９０ｎｍ／５２０ｎｍで即座に開始し、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５プレートリーダーで５分ごとに１時間読み取った。所与の治療後の血漿試料の動的蛍光測定読み出しの線形部分の傾きを、同じ動物からの治療前の血漿試料の傾きと比較して、基底％を計算する。

【０６０６】

１．７．１ 非ヒト霊長類における血漿カリクレインレベルのエレクトロケミルミネッセンスベース検出

非ヒト霊長類（ＮＨＰ）の血漿カリクレインレベルを、ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ（ＭＳＤ）によるエレクトロケミルミネッセンス検出プラットフォームを使用するイムノアッセイにより測定した。９６ウェルＭＳＤ標準プレート（カタログ番号Ｌ１５ＸＡ）を、ＰＢＳ中１μｇ／ｍＬの濃度で、４０μＬのカリクレイン用マウスモノクローナル捕捉抗体（ＬＳ－Ｂｉｏ、ＬＳ－Ｃ３８３０８）を用い、４℃で一晩コーティングした。翌日、ウェルを洗浄し、次いで１５０μＬの３％ Ｂｌｏｃｋｅｒ－Ａ（ＭＳＤ、カタログ番号Ｒ９３ＡＡ）を用いてブロックし、室温で１時間、７００ｒｐｍに設定されたシェーカー上でインキュベートした。洗浄後、内部で作製した既知の濃度のＮＨＰカリクレイン標準物質とともに、カリクレイン濃度を決定するためのＮＨＰ試料をウェルに添加し、７００ｒｐｍに設定したシェーカー上で室温で２時間インキュベートした。試料お

よび標準物質の両方を、０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含む１％ブロッカー－Ａで希釈した。

【０６０７】

洗浄後、検出抗体溶液２５μＬを添加し、室温で１時間インキュベートした。プレートを洗浄し、１５０μＬのＭＳＤ金リード緩衝液（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、カタログ番号Ｒ９２ＴＧ）を各ウェルに添加した。ＱｕｉｃｋＰｌｅｘ ＳＱ １２０（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を使用してプレートを読み取った。プレートを、異なるステップの間に０．０５％のＴｗｅｅｎ ２０を含むＰＢＳで３回洗浄した。

【０６０８】

１．８ 血管透過性アッセイ

エバンスブルー血管透過性アッセイは、ＨＡＥの試験におけるモデルとして使用することができる浮腫および血管漏出の確立されたモデルである（例えば、Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｊｅｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３を参照されたい）。このアッセイは、試験動物、典型的にはマウスにおけるアルブミン結合色素であるエバンスブルーの注射に基づく。生理学的条件下では、内皮は、アルブミンに対して不透過性であるため、アルブミンに結合したエバンスブルーは、血管内に拘束されたままである。血管透過性の増加を促進する病理学的条件において、エバンスブルーの血管外漏出は、例えば、静脈内注射後のマウスの耳、足、および鼻における青色の存在によって定性的に、または組織、例えば、腸に組み込まれる色素の測定によって定量的に、容易に観察することができる。

【０６０９】

ｈｕＫＬＫＢ１マウスを使用して、血管透過性のためのモデルを開発して、過剰なブラジキニン産生の影響を軽減するためのＫＬＫＢ１編集の可能性を評価した（Ｂｈａｔｔａｃｈａｒｊｅｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。ｓｇＲＮＡを標的とする修飾ＫＬＫＢ１およびＣａｓ９ ｍＲＮＡを、０．０３ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇおよび０．３ｍｇ／ｋｇの総ＲＮＡ用量で、用量応答において投与した。追加の群を、０．３ｍｇ／ｋｇの非標的化ＬＮＰ対照およびＴＳＳビヒクル対照で治療した。投与から１３日後、アンジオテンシン変換酵素（ＡＣＥ）阻害剤カプトプリルの２．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内注射を使用して、血管透過性を誘導した。１５分後、エバンスブルー色素（３０ｍｇ／ｋｇ）およびデキストラン硫酸塩（０．３ｍｇ／ｋｇ）の混合物を静脈内尾注射により投与した。この注射の１５分後に動物を安楽死させ、Ｃｌａｒｉｏｓｔａｒプレートリーダー（ＢＭＧ ＬａｂＴｅｃｈ）を介して、６００ｎｍの吸光度での光学密度（ＯＤ）によって結腸への色素血管外漏出を評価した。肝臓および血清を収集して、それぞれｈｕＫＬＫＢ１遺伝子編集およびカリクレインタンパク質を定量化した。

【０６１０】

実施例２：スクリーニングおよびインビトロでのガイド特性決定

２．１．ヒトＫＬＫＢ１を標的とするデュアルガイドＲＮＡ（ｄｇＲＮＡ）のスクリーニング

ヒトＫＬＫＢ１を標的とするガイドをデュアルガイドＲＮＡとして調製し、実施例１に記載されるように、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）および初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）へのトランスフェクションによって評価した。細胞を、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために治療後４８時間かけて溶解させた。表６に示すガイドを試験した。

【表３８】

表６．ヒトおよびカニクイザルのデュアルガイドおよびシングルガイド

ヒト dgRNA	ヒトガイド配列	配列番号	ヒト sgRNA	カニクイザル sgRNA
CR005916	ACAGGAAACUGUAGCAAACA	1	G012253	NA
CR005917	AUAGAUAAUUCACUUACCAC	2	G012254	NA
CR005918	UACAUCCCCACCUCUGAAGA	3	G012255	NA
CR005919	AACUGAAUAGCAAACACCUU	89	NA	NA
CR005920	ACAAUUACCAAUUUCUGAAA	90	NA	NA
CR005921	UACAAUUACCAAUUUCUGAA	91	NA	NA
CR005922	UCUUGAGGAGUAGAGGAACU	4	G012256	NA
CR005923	GGUGUUUUCUUGAGGAGUAG	92	NA	NA
CR005924	ACCAGGUAAAGUUCUUUUGC	5	G012257	NA
CR005925	GGGUAAAUUUUAGAAUGGCA	6	G012258	NA
CR005926	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	93	NA	G013884
CR005927	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	94	NA	G013925
CR005928	AUUUACCCGGGAGUUGACUU	7	G012259	NA
CR005929	UACCCGGGAGUUGACUUUGG	8	G012260	NA
CR005930	UAUGGGACACAAGGGAGCUC	95	NA	NA
CR005931	UCUUUGAGAUUGUGUAACAC	9	G012261	NA
CR005932	CUUUGAGAUUGUGUAACACU	10	G012262	NA
CR005933	UUUGAGAUUGUGUAACACUG	11	G012263	NA
CR005934	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	96	NA	G013912
CR005935	UGGAGGAACAAACUCUUCUU	97	NA	NA
CR005936	CAAACUCUUCUUGGGGAGAG	98	NA	NA
CR005937	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	99	NA	G013886
CR005938	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	100	NA	G013938
CR005939	GGUCACUCAUAGGACACCAG	101	NA	G013946
CR005940	GUCACUCAUAGGACACCAGU	102	NA	G013896
CR005941	ACUGCUGCCCACUGCUUUGA	103	NA	NA
CR005942	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	104	NA	G013902
CR005943	UACAUACCAGUGUAAUUCAA	12	G012264	NA
CR005944	AGGAACACCUACCGCUAUAA	105	NA	G013871
CR005945	CUCCGGGACUGUACUUUAAU	106	NA	G013889
CR005946	GUCCCAUACGCAAUCCUAGU	107	NA	G013890

CR005947	CUCAGCACCUUUAUAGCGGU	108	NA	G013892
CR005948	UAUAGCGGUAGGUGUUCCUC	109	NA	G013874
CR005949	CUCCAACUAGGAUUGCGUAU	13	G012265	G013933
CR005950	CUAUUAAAGUACAGUCCCGG	110	NA	G013875
CR005951	AGGAUUGCGUAUGGGACACA	14	G012266	G013904
CR005952	GGAUUGCGUAUGGGACACAA	15	G012267	G013901
CR005953	GUGCUGAGUAACGUGGAAUC	111	NA	G013883
CR005954	UAUAAAGGUGCUGAGUAACG	112	NA	G013878
CR005955	UCUCCAACUAGGAUUGCGUA	113	NA	G013908
CR005956	GUUACUCAGCACCUUUAUAG	16	G012268	G013945
CR005957	AUAGCGGUAGGUGUUCCUCC	114	NA	G013873
CR005958	CUGCCAAAAGUACAUCGAAC	115	NA	G013877
CR005959	UGCCUAUUAAAGUACAGUCC	17	G012269	NA
CR005960	CUAUGGAUGGUUCUCCAACU	18	G012270	G013922
CR005961	ACCAAUUUCUGAAAGGGCAC	116	NA	NA
CR005962	GUGUUUCUUAAGAUUAUCUA	117	NA	NA
CR005963	GAUGUUUGGCGCAUCUAUAG	19	G012271	G013921
CR005964	CCAAUUUCUGAAAGGGCACA	118	NA	NA
CR005965	UUCUUAAGAUUAUCUAUGGA	119	NA	G013940
CR005966	CUGUUCGAUGUACUUUUGGC	120	NA	NA
CR005967	UGUUCGAUGUACUUUUGGCA	121	NA	G013880
CR005968	GGUGGAAUGUGCACCUCAUC	122	NA	G013939
CR005969	GUCCGACACACAAAAGCAUC	123	NA	G013894
CR005970	AUGCGCCAAACAUCCUGCAG	20	G012272	G013885
CR005971	AAACUGGCAGCGAAUGUUAC	124	NA	G013930
CR005972	UGCCACGCAAACAUUUCACA	125	NA	NA
CR005973	GCACCUGUUCGAUGUACUUU	126	NA	G013870
CR005974	AGAUGCGCCAAACAUCCUGC	127	NA	NA
CR005975	GCACCUCAUCUGGCAGUAUU	128	NA	NA
CR005976	CAUCUGAGAACGCAAGAUGC	129	NA	G013934
CR005977	AUGCCCAAUACUGCCAGAUG	130	NA	NA
CR005978	UGCACCUCAUCUGGCAGUAU	131	NA	G013944
CR005979	CUCCUUUAUAAAUGUCUCGA	21	G012273	G013905
CR005980	AUGUCAUUGAUUGAACUUGC	132	NA	G013936
CR005981	ACAAGCACACGCAUUGUUGG	133	NA	G013893

CR005982	UGUUACUGGUGCACCUUUUU	22	G012274	NA
CR005983	GAUGCGCCAAACAUCCUGCA	23	G012275	G013876
CR005984	UAUCGCCUUGAUAAAACUCC	134	NA	G013926
CR005985	CCUCAAGAAAACACCAUAUC	135	NA	G013906
CR005986	AAACGCCUUCUUCAGAGGUG	136	NA	NA
CR005987	AAAACAAGCACACGCAUUGU	137	NA	G013891
CR005988	CAUCGAACAGGUGCAGUUUC	138	NA	G013879
CR005989	GGCUUCCCCUGCAGGAUGUU	139	NA	G013881
CR005990	UUGAUGACCACAUUGCUUCA	140	NA	G013937
CR005991	AGGAGCCUGGAGUUUUAUCA	141	NA	NA
CR005992	AUCUGGCAGUAUUGGGCAUU	24	G012276	G013915
CR005993	UGCCAUCGAGACAUUUAUAA	142	NA	G013899
CR005994	GCGUGGCAUAUGAAAAAAAC	25	G012277	NA
CR005995	UAUAAAGGAGUUGAUAUGAG	26	G012278	G013913
CR005996	AGCAAGUUCAAUCAAUGACA	143	NA	G013897
CR005997	GGACAUUCCUUGAAGCAAUG	144	NA	NA
CR005998	ACACCUUGAAUUGUACUCAC	27	G012279	NA
CR005999	GUUGGGGUGAUAGGUGCAGA	145	NA	NA
CR006000	GAAAACGCCUUCUUCAGAGG	146	NA	NA
CR006001	UAUGAAAACGCCUUCUUCAG	147	NA	NA
CR006002	CUCAGAUGUGGAUGUUGCCA	148	NA	NA
CR006003	CUCUCCUAGGCUUCCCCUGC	149	NA	NA

【０６１１】

ｄｇＲＮＡについて、２つの別々のＰＨＨおよびＰＣＨ集団のセットで編集を決定した。ガイド配列のスクリーニングデータを、上の表６に列挙する。表７Ａおよび図１Ａ～１Ｂは、初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）（Ｎ＝２）におけるＳｐｙ　Ｃａｓ９タンパク質と共トランスフェクトされたＫＬＫＢ１標的化ガイドの編集率を示し、表７Ｂおよび図１Ｃ～１Ｄは、初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）（Ｎ＝２）についての編集率を示す。

【０６１２】

セット２からの一番成績のよいガイドＲＮＡおよび対応する編集データは、表７Ａおよび７Ｂにおいて、アスタリスク（＊）を付されている。比較した場合、このセットは、高度に相関関係にあると決定された（Ｓｐｅａｒｍａｎ　Ｒ＝０．９８５）。

【表３９】

表７Ａ：初代ヒト肝細胞に送達されたデュアルガイドのＫＬＫＢ１編集データプライマーセット１および２

	セット１			セット２	
ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%
CR005916*	44.8	4.67	CR005916*	46.8	1.7
CR005917*	45.75	1.77	CR005917*	49.9	4.38
CR005918	ND	ND	CR005918	ND	ND
CR005919	24.6	0.28	CR005919	28.9	4.81
CR005920	9.35	0.35	CR005920	10.7	0.99
CR005921	6.15	1.06	CR005921	5.55	0.64
CR005922	ND	ND	CR005922	19.25	1.91
CR005923	19.25	4.74	CR005923	20.35	2.76
CR005924	6.1	0.71	CR005924	5.55	0.78
CR005925*	35.55	1.06	CR005925*	36.3	1.41
CR005926	11.95	4.45	CR005926	11.2	2.83
CR005927	29.2	4.24	CR005927	30.4	2.97
CR005928	ND	ND	CR005928	33.45	4.03
CR005929	ND	ND	CR005929	51.35	0.07
CR005930*	32.45	0.21	CR005930*	32.6	8.06
CR005931*	37.85	5.02	CR005931*	33.15	1.63
CR005932*	62.25	3.04	CR005932*	63.25	4.6
CR005933*	70.05	1.91	CR005933*	62.45	2.47
CR005934	17	2.12	CR005934	16.5	0.71
CR005935	26.25	0.35	CR005935	26.45	3.75
CR005936	4.55	0.64	CR005936	5	0.71
CR005937*	32.6	0.99	CR005937*	32.45	1.63
CR005938*	39.25	8.7	CR005938*	36.85	5.87
CR005939	27	0.57	CR005939	24.85	3.46
CR005940	16.7	2.12	CR005940	17.15	1.91
CR005941	8.9	0.85	CR005941	8.95	1.48
CR005942	19.8	0.71	CR005942	20.05	0.49
CR005943*	38.3	6.08	CR005943*	38.05	3.32
CR005944	23.55	1.91	CR005944	22.05	4.17

CR005945	21.95	1.63	CR005945	23.05	1.63
CR005946	29.35	2.47	CR005946	27.4	2.55
CR005947	12.4	2.97	CR005947	12.55	1.63
CR005948	15.2	1.56	CR005948	14.5	0.85
CR005949	19.15	2.33	CR005949	19.5	0.99
CR005950	21.6	2.12	CR005950	19.2	1.7
CR005951*	44.9	1.41	CR005951*	43.45	3.75
CR005952*	63.4	3.11	CR005952*	64.4	2.26
CR005953	5.7	0	CR005953	6.35	1.06
CR005954	12.5	1.7	CR005954	12.8	0.57
CR005955	24.65	3.04	CR005955	24.95	0.64
CR005956*	31.35	0.92	CR005956*	30.55	4.88
CR005957	22.95	2.05	CR005957	24.8	1.41
CR005958	16.45	1.2	CR005958	12.05	2.33
CR005959*	42.4	3.11	CR005959*	42.95	4.17
CR005960*	38.7	0.57	CR005960*	41.1	4.38
CR005961	15.2	0.71	CR005961	13.8	3.25
CR005962*	31.4	0	CR005962*	29.65	0.92
CR005963	ND	ND	CR005963	45.25	9.97
CR005964	17.45	1.91	CR005964	15.65	3.89
CR005965	25.25	2.33	CR005965	22.25	0.21
CR005966	8.35	2.9	CR005966	6.15	0.49
CR005967	19.5	2.55	CR005967	16.7	3.11
CR005968	11.55	2.33	CR005968	11.65	1.91
CR005969	13.5	2.26	CR005969	12.35	3.75
CR005970	ND	ND	CR005970	22.25	4.17
CR005971	1.1	0.42	CR005971	1.15	0.64
CR005972	13.65	1.63	CR005972	12.1	2.97
CR005973	6.45	0.21	CR005973	5.25	1.06
CR005974	ND	ND	CR005974	16.7	1.27
CR005975	7.95	1.34	CR005975	6.75	0.92
CR005976	ND	ND	CR005976	14.6	0.99
CR005977	12.2	2.69	CR005977	13.65	3.32
CR005978	9.95	1.06	CR005978	9.25	0.92
CR005979	22.35	1.63	CR005979	22.15	0.21

CR005980	18.2	2.26	CR005980	21.25	0.78
CR005981	18.2	1.27	CR005981	17.8	0.42
CR005982	6.25	1.77	CR005982	3.95	2.76
CR005983*	53	NA	CR005983*	43.3	9.9
CR005984	17.7	7.07	CR005984	18.45	5.73
CR005985	15.1	8.91	CR005985	16.3	0.71
CR005986	ND	ND	CR005986	ND	ND
CR005987	10.6	2.12	CR005987	9.8	0.85
CR005988	8.55	2.05	CR005988	6.4	1.13
CR005989	ND	ND	CR005989	4.9	0.42
CR005990	ND	ND	CR005990	20.2	6.36
CR005991	28.15	2.9	CR005991	26.9	4.81
CR005992	1.65	0.21	CR005992	4.85	0.92
CR005993*	38	1.27	CR005993*	31.35	1.2
CR005994*	33.4	1.98	CR005994*	36.4	1.98
CR005995	22.55	2.47	CR005995	30.65	7.14
CR005996	16.55	0.64	CR005996	13.75	3.46
CR005997	22.05	1.2	CR005997	16.45	3.61
CR005998*	56.65	2.33	CR005998*	59.05	14.07
CR005999	25	3.68	CR005999	22.45	2.19
CR006000	ND	ND	CR006000	ND	ND
CR006001	ND	ND	CR006001	ND	ND
CR006002	23.25	3.75	CR006002	20.85	2.05
CR006003	ND	ND	CR006003	7	1.13

＊「選択されたｄｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【表４０】

表７Ｂ：初代カニクイザル肝細胞に送達されたｃｒＲＮＡのＫＬＫＢ１編集データセット１および２

	セット１			セット２	
ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%
CR005916*	26.6	2.4	CR005916*	26.1	1.8
CR005917*	31.5	3.3	CR005917*	33.2	2.8
CR005918*	0.6	0.2	CR005918	ND	ND
CR005919*	2.5	ND	CR005919*	3.2	0.3
CR005920*	0.4	0.1	CR005920	0.1	0.1
CR005921	0.1	0.0	CR005921	0.1	0.1
CR005010	72.8	0.2	CR005010	65.7	0.9
CR005922*	0.5	0.1	CR005922*	0.6	0.3
CR005923	0.4	0.1	CR005923	0.3	0.1
CR005924	0.2	0.0	CR005924	0.2	0.2
CR005925*	0.7	0.4	CR005925*	1.5	0.3
CR005926	0.0	0.0	CR005926	0.0	0.0
CR005927*	3.1	0.8	CR005927*	3.2	0.2
CR005928*	3.3	1.6	CR005928*	2.2	0.4
CR005929*	13.0	2.7	CR005929*	12.5	0.0
CR005930*	5.0	0.9	CR005930*	3.6	1.3
CR005931*	1.3	0.0	CR005931*	2.3	0.0
CR005932*	15.5	3.5	CR005932*	12.2	5.7
CR005933*	21.5	2.6	CR005933*	16.6	ND
CR005934	ND	ND	CR005934	0.3	0.2
CR005935	ND	ND	CR005935*	2.0	0.1
CR005936	0.1	0.0	CR005936	ND	ND
CR005937*	2.8	0.1	CR005937*	2.9	0.1
CR005938*	5.8	0.4	CR005938*	6.2	0.0
CR005939*	2.3	0.1	CR005939*	1.9	0.4
CR005940*	1.2	0.3	CR005940*	1.2	0.3
CR005025	31.3	10.8	CR005025	36.5	ND
CR005941	0.4	0.1	CR005941*	0.3	0.0
CR005942*	1.2	0.6	CR005942*	1.0	0.8
CR005943*	4.0	0.4	CR005943*	3.1	0.0
CR005020	29.5	1.5	CR005020	30.7	0.6
CR003187	14.5	0.6	CR003187	15.2	2.2
CR005964	0.3	0.4	CR005964	0.1	0.1
CR005032	5.3	1.6	CR005032	4.5	0.9

＊「選択されたｄｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【０６１３】

２．１．１　ＰＨＨおよびＰＣＨにおけるｓｇＲＮＡの交差スクリーニング、編集

ＫＬＫＢ１を標的とする選択されたガイド配列を、ｓｇＲＮＡとして調製し、ＰＨＨおよびＰＣＨにおいてさらに評価した。ＰＨＨおよびＰＣＨ（Ｇｉｂｃｏ、ロットＨｕ８２９８）を調製し、実施例１に記載されるようにＲＮＰでトランスフェクトした。細胞を、それぞれ、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために処理後４８時間および７２時間かけて溶解させた。表８Ａおよび図２Ａ～図２Ｂは、ＰＨＨにおける編集率を示し、表８Ｂおよび図２Ｃ～図２Ｄは、ＰＣＨにおける編集率を示す。

【０６１４】

【表４１】

表８Ａ：初代ヒト肝細胞に送達されたｓｇＲＮＡのＫＬＫＢ１編集データセット１および２

	セット１			セット２	
ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%
G012321*	64.7	5.8	G012321*	62	5.5
G012102	64	5.7	G012102	63.6	4.7
G012293*	63.5	4.4	G012293*	61.6	3.9
G009246	63.3	3.1	G009246	62.3	4.6
G012308*	59.0	1.6	G012308*	59	1.5
G012253*	58.6	3.5	G012253*	59.1	1.7
G012319*	55.3	0.9	G012319*	55.1	3.6
G012298*	53.1	4.2	G012298*	54	4.9
G012320*	52.5	5.5	G012320*	51.9	7.7
G012290*	52.0	1.4	G012290*	51.7	0.9
G012304*	48.7	2.7	G012304	NA	NA
G012323*	47.4	1.4	G012323*	49.1	1.1
G012280*	46.2	4.0	G012280*	45.4	5.4
G012305*	46.1	5.2	G012305	NA	NA
G012303*	45.4	7.4	G012303	NA	NA
G012285*	45.1	7.6	G012285*	45.2	8.6
G012335*	45.1	2.4	G012335*	44.7	3.2
G012286*	44.7	5.3	G012286*	43.9	3.5
G000644	42.4	9.9	G000644	42.7	9.5
G012294*	42.0	1.3	G012294*	43	2.4

G009267	41.6	0.6	G009267	45.8	1.3
G009285	37.7	1.7	G009285	35.6	1.3
G012334*	36.4	2.5	G012334*	36	5.3
G012325*	36.2	1.8	G012325*	36.4	3.6
G012296*	35.9	6.2	G012296*	35.4	7.8
G012331	35.5	3.0	G012331*	35.7	1.2
G012306	34.9	1.8	G012306	NA	NA
G012313	34.9	1.3	G012313*	36.3	3.3
G012297	34.4	4.7	G012297	32.7	4.7
G012322	32.9	0.4	G012322	33.2	0.4
G012299	32.4	0.7	G012299	NA	NA
G012333	31.3	0.4	G012333	32.3	3.3
G012328	31.2	2.3	G012328*	34.9	0.1
G012309	30.4	0.1	G012309	29.9	2.3
G009321	29.9	2	G009321	31.8	4.5
G012338	29.0	2.2	G012338	29.7	2.3
G012283	26.2	4.2	G012283	24.9	4.1
G012291	25.3	2.3	G012291	24.7	3.7
G012302	23.2	NA	G012302	24.6	3.1
G012337	23.0	2.3	G012337	23.6	0.5
G012311	22.8	0.8	G012311	23.9	0.2
G012144	22.6	1.5	G012144	22.9	0.9
G012327	22.4	3.5	G012327	21.7	3.4
G012316	22.3	0.1	G012316	21.1	0.5
G000645	22	0.7	G000645	22.5	1.6
G012281	20.9	0.1	G012281	21.5	0.1
G012300	19.2	2.6	G012300	NA	NA
G012310	19.2	2.5	G012310	18.2	0.1
G012329	19.2	1.6	G012329	21.7	0.8
G012318	18.8	0.7	G012318	17.5	0.6
G012314	18.6	0.7	G012314	19.6	2.7

G012326	18.4	3.2	G012326	18.5	3.2
G012295	17.7	3.6	G012295	17.6	5.7
G012287	17.2	0.4	G012287	17	2.4
G012288	16.7	0.1	G012288	15.4	0.3
G012339	16.5	2.6	G012339	17.6	1.3
G012284	15.3	0.3	G012284	15.4	1.5
G012324	15.3	2.2	G012324	19.1	3.5
G012289	14.3	1.8	G012289	13.6	0.8
G012312	14.0	0.8	G012312	14.4	NA
G012292	13.4	3.6	G012292	12.9	3
G012330	13.3	1.9	G012330	12.9	0.6
G012315	13.0	0.1	G012315	12.8	1.9
G012332	12.6	1.0	G012332	11.5	0.6
G012340	10.5	2.3	G012340	13.9	1.8
G012301	9.2	0.1	G012301	NA	NA
G012336	7.5	1.6	G012336	6.3	1.8
G012282	7.3	1.2	G012282	8.6	2.3
G012307	5.3	0.2	G012307	NA	NA
G012317	3.5	0.6	G012317	3.5	0.7
G012260	1.9	0.6	G012260	1.8	0.1
G012254	1.6	0.2	G012254	0.7	0.3
G012266	1.0	0.1	G012266	1.9	0.6
G012256	0.8	0.4	G012256	0.2	0
G012274	0.8	0.1	G012274	0.7	0.1
G012259	0.6	0.1	G012259	0.6	0.1
G012262	0.5	0.1	G012262	0.6	0.2
G012276	0.5	0.0	G012276	0.8	NA
G012257	0.4	0.1	G012257	0.1	0
G012277	0.4	0.1	G012277	0.4	0.1
G012261	0.2	0.1	G012261	0.2	0.1
G012270	0.2	0.1	G012270	0.1	0
G012255	0.1	0.1	G012255	0.1	0.1
G012258	0.1	0.0	G012258	0.1	0.1
G012263	0.1	0.0	G012263	0.1	0

G012264	0.1	0.0	G012264	0.2	0.1
G012265	0.1	0.0	G012265	0.1	0
G012267	0.1	0.0	G012267	0.2	0.1
G012268	0.1	0.0	G012268	0.1	0.1
G012269	0.1	0.0	G012269	0.1	0.1
G012272	0.1	0.1	G012272	0.1	0
G012273	0.1	0.1	G012273	0.1	0.1
G012275	0.1	0.0	G012275	0.2	0.1
G012278	0.1	0.0	G012278	0.1	0.1
G012279	0.0	0.0	G012279	0.1	0.1
G012271	NA	NA	G012271	0.1	0

＊「選択されたｄｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【表４２】

表８Ｂ：初代カニクイザル肝細胞に送達されたｓｇＲＮＡのＫＬＫＢ１編集データセット１および２

	セット１			セット２	
ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%	ガイドID	編集平均%	編集標準偏差%
G000644	35.9	3.5	G000644	37.4	2.3
G000645	64.1	0.2	G000645	65	0.1
G009246	92.7	1.2	G009246	93	0.9
G009267	84	1.6	G009267	83.3	1.9
G009285	82.5	0.3	G009285	80.7	0.7
G009321	46.8	17	G009321	46.3	12.8
G012102	91.4	0.5	G012102	92.4	0.1
G012144	45.3	0.6	G012144	45.4	4.2
G012253*	92	0.3	G012253*	90.4	1.3
G012254	2.3	0.1	G012254*	2.8	0.1
G012255	0	0	G012255	0.1	0
G012256	0.1	0	G012256	0.1	0
G012257	0.1	0	G012257	0.2	0
G012258	NA	NA	G012258	0.1	0.1
G012259	0.3	0.1	G012259	0.3	0.1
G012260	0.6	0	G012260*	0.8	0.1
G012261	0.2	0.1	G012261	0.2	0.1
G012262	0.3	0.2	G012262	0.4	0.1
G012263	0.2	0.1	G012263	0.2	0.1
G012264	0.1	0	G012264	0.1	0
G012265	NA	NA	G012265	0.1	0
G012266	0.3	0.1	G012266	0.3	0.1
G012267	0.2	0.1	G012267	0.1	0
G012268	0.1	0.1	G012268	0.1	0
G012269	0.1	0	G012269	0.1	0
G012270	NA	NA	G012270*	4.8	0.7
G012271	0.2	0.1	G012271	0	0
G012274	NA	NA	G012274	0.6	0.2
G012277	0.6	0.1	G012277	0.6	0
G012278	0	0	G012278	0.2	0.1

G012279	0.2	0.1	G012279	0.1	0
G012280*	42.2	1.6	G012280*	39.1	5.6
G012282*	8.8	0.3	G012282*	10.3	NA
G012283*	50.5	NA	G012283*	53.7	3.2
G012284	0.3	0.2	G012284	0.2	0
G012285*	30.2	4.9	G012285*	30.5	0.8
G012287	0.1	0	G012287	0.1	0
G012291	5.5	0.8	G012291*	4.8	1.3
G012292	6.4	0.3	G012292*	6.3	0.7
G012293*	86.6	0.1	G012293*	83.3	6.8
G012294*	53.6	1.5	G012294*	52.1	0.3
G012295*	6.7	0.1	G012295*	7	0.8
G012296*	51.4	2.1	G012296*	49	3.4
G012297	NA	NA	G012297*	41.9	0.4
G012299*	38.2	0.9	G012299	NA	NA
G012300*	28.5	4.6	G012300	NA	NA
G012301*	7.6	2	G012301	NA	NA
G012302*	39.9	2.8	G012302	NA	NA
G012303*	13.8	1.1	G012303	NA	NA
G012304*	69.7	2.8	G012304	NA	NA
G012305*	16	0.1	G012305	NA	NA
G012307	0.3	0.2	G012307	NA	NA
G012308*	57.7	3.9	G012308*	58.1	0.7
G012309*	55.9	7.3	G012309*	55.1	3.7
G012310*	27	2.3	G012310*	27	1.9
G012311	4	0.1	G012311*	3.6	1.8
G012312*	14.4	0.5	G012312*	14.7	0.3

＊「選択されたｓｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【０６１５】

２．２．初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）におけるｓｇＲＮＡのスクリーニング、編集およびタンパク質ノックダウン

３つのＰＨＨロット（Ｈｕ８２９６、Ｈｕ８３００、およびＨｕ８２８４）を、実施例１に記載されるように個別にプレーティングし、リポフェクションの前に、３７℃、５％ＣＯ２で２４時間インキュベートした。１０μＭのｓｇＲＮＡガイド６．８８μＬおよび５００ｎｇ／μｌのＣａｓ９　ｍＲＮＡ４．５μＬの混合物を、総体積１１．４μｌの水中で調製した。実施例１に記載のリポフェクション試薬を室温まで解凍した。ガイド／Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ混合物を、４．８μＬの５０ｍＭクエン酸ナトリウム／２００ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ５）、４．８μＬのリポフェクション試薬、および５４μＬの分子グレード水とともに順次添加して、１試料当たり総体積７５μＬを調製した。リポフェクション試料を、３％のＦＢＳまたはカニクイザル血清を含有する培地であるＷｉｌｌｉａｍ’ｓ

ＥまたはＣｅｌｌａｒｔｉｓ　Ｐｏｗｅｒ　Ｐｒｉｍａｒｙ　ＨＥＰ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）とともに３７℃で１０分間、予めインキュベートした後、細胞に添加した。細胞を、３００ｎｇのＣａｓ９　ｍＲＮＡおよび３０２ｎｇのガイドｓｇＲＮＡを含有する１０μＬの調製されたリポフェクション試料でトランスフェクションした。

【０６１６】

細胞を、ＮＧＳ分析のためにトランスフェクトから７２時間後に溶解し、実施例１に記載されるように実施した。

【０６１７】

ＥＬＩＳＡによる分泌タンパク質分析またはウエスタンブロッティングによる細胞内タンパク質分析のために利用される細胞については、トランスフェクション後７２時間で培地を吸引し、Ｃｅｌｌａｒｔｉｓ　Ｐｏｗｅｒ　Ｐｒｉｍａｒｙ　ＨＥＰ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）と交換した。培地を吸引し、２日ごとに交換した。分泌タンパク質の低下を決定するために使用した試料については、培地をウェルから吸引し、収穫前に２４～４８時間インキュベートした新鮮な培地で置き換えた。培地を収集し、９６ウェルＰＣＲプレートに移し、アッセイで使用する前に－２０℃で保管した。

【０６１８】

表８Ｃおよび図３Ａ～３Ｂは、３つのＰＨＨロットのトランスフェクションに基づく編集率および分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを示す。２０個のガイドを、ＰＨＨロットの対で比較し、図３Ｃ～３Ｅに示されるように、高度に相関関係にあると決定された（Ｓｐｅａｒｍａｎ　Ｒ＞０．８）。

【表４３】

表８Ｃ．ＰＨＨにおけるＫＬＫＢ１インデル頻度および分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベル

	PHH ロット 1-HU8296				PHH ロット 2-HU8284				PHH ロット 3-HU8300			
ガイド ID	インデル頻度	SD	分泌 KLKB1	SD	インデル頻度	SD	分泌 KLKB1	SD	インデル頻度	SD	分泌 KLKB1	SD
G012253	0.32	0.01	1.54	0.03	0.63	0.06	0.24	0.00	0.49	0.01	0.43	0.11
G012254	0.12	0.01	7.22	0.33	0.40	0.09	0.57	0.05	0.15	0.00	1.61	0.06
G012255	0.02	0.00	15.72	0.70	0.22	0.02	5.05	0.26	0.03	0.01	5.33	0.08
G012256	0.10	0.03	9.26	0.13	0.43	0.05	1.57	0.31	0.11	0.00	2.69	0.07
G012257	0.00	0.00	22.99	0.45	0.08	0.04	8.75	0.28	0.00	0.00	3.71	0.21
G012258	0.13	0.01	4.24	0.02	0.26	0.02	3.89	0.03	0.09	0.02	2.76	0.00
G012259	0.27	0.01	2.18	0.01	0.55	0.07	1.02	0.01	0.35	0.01	0.91	0.13
G012260	0.69	0.03	0.07	0.02	0.73	0.03	0.05	0.01	0.82	0.03	-0.50	0.01
G012261	0.06	0.00	14.26	0.77	0.38	0.03	3.39	0.11	0.07	0.02	3.84	0.28
G012262	0.48	0.03	1.65	0.05	0.74	0.04	0.68	0.09	0.53	0.03	1.40	0.10
G012263	0.42	0.02	2.48	0.06	0.67	0.03	0.78	0.02	0.53	0.03	0.55	0.16
G012264	0.32	0.02	1.97	0.02	0.65	0.07	0.54	0.03	0.26	0.01	2.02	0.09
G012265	0.11	0.00	6.24	0.02	0.29	0.09	1.36	0.10	0.11	0.01	1.10	0.03
G012266	0.42	0.01	1.30	0.02	0.61	0.05	0.87	0.03	0.45	0.02	0.15	0.02
G012267	0.72	0.00	0.23	0.02	0.79	0.02	0.14	0.00	0.82	0.00	-0.52	0.01
G012268	0.20	0.01	4.78	0.14	0.44	0.01	1.65	0.06	0.30	0.01	1.05	0.03
G012269	0.18	0.03	4.10	0.06	0.68	0.01	0.52	0.07	0.25	0.00	2.79	0.04
G012270	0.48	0.01	0.46	0.02	0.77	0.02	0.21	0.00	0.67	0.06	-0.13	0.04
G012271	0.10	0.02	3.16	0.02	0.58	0.06	0.79	0.04	ND	0.00	0.87	0.05
G012272	0.12	0.02	6.42	0.09	0.53	0.06	1.16	0.03	0.21	0.01	0.09	0.02
G012273	0.07	0.01	9.39	0.03	0.16	ND	0.82	0.04	0.07	0.00	2.14	0.06
G012274	0.04	0.00	15.14	0.43	0.38	0.11	2.73	0.03	ND	0.00	4.13	0.04
G012275	0.54	0.00	2.35	0.02	0.75	0.03	0.89	0.00	0.62	0.02	0.33	0.00
G012276	0.01	0.00	20.54	0.24	0.09	0.00	4.56	0.18	0.03	0.00	3.92	0.03
G012277	0.28	0.05	3.39	0.08	0.57	0.00	1.61	0.01	0.22	0.03	2.22	0.01

G012278	0.22	0.01	1.61	0.03	0.64	0.04	0.50	0.00	0.42	0.02	-0.08	0.01
G012279	0.40	0.05	2.56	0.08	0.59	0.03	1.51	0.02	0.53	0.03	-0.12	0.01
G012280	0.39	0.02	1.34	0.06	0.55	0.04	0.52	0.01	0.44	0.02	0.08	0.00
G012285	0.24	0.00	2.53	0.01	0.56	ND	1.23	0.06	0.26	0.00	1.60	0.06
G012286	0.26	0.01	2.56	0.05	0.48	0.12	1.06	0.01	0.33	0.01	0.55	0.02
G012290	0.13	0.00	14.44	0.06	0.60	0.01	5.45	0.06	0.29	0.00	2.41	0.04
G012293	0.00	0.00	21.78	0.26	0.00	0.00	6.39	0.02	0.54	0.04	0.21	0.02
G012294	0.23	0.01	2.12	0.16	0.62	0.02	0.39	0.06	0.34	0.02	0.29	0.08
G012296	0.22	0.00	2.89	0.11	0.58	0.05	0.90	0.04	0.35	0.01	0.55	0.04
G012298	0.37	0.01	2.19	0.01	0.68	0.05	0.72	0.03	0.63	0.01	-0.04	0.00
G012303	0.40	0.03	0.52	0.02	0.70	0.05	0.38	0.00	0.38	0.03	0.04	0.00
G012304	0.30	0.02	0.89	0.09	0.26	ND	0.20	0.01	0.27	0.03	1.31	0.06
G012305	0.38	0.03	0.79	0.07	0.73	0.03	0.32	0.01	0.51	0.02	0.04	0.00
G012308	0.18	0.02	1.79	0.13	0.72	0.03	0.53	0.04	0.33	0.01	-0.03	0.01
G012319	0.26	0.00	1.45	0.03	0.25	0.02	3.62	0.76	0.32	0.03	0.80	0.00
G012320	0.21	0.00	2.24	0.11	0.63	0.03	0.88	0.01	0.32	0.01	1.17	0.02
G012321	0.45	0.00	0.49	0.07	0.72	0.01	0.49	0.09	0.60	0.07	-0.09	0.02
G012323	0.28	0.00	1.32	0.01	0.48	0.12	0.75	0.17	0.33	0.00	0.01	0.02
G012325	0.40	0.02	2.51	0.01	0.62	0.00	1.37	0.68	0.50	0.05	0.27	0.02
G012334	0.10	0.00	7.52	0.18	0.19	ND	2.86	0.14	0.06	0.02	3.07	0.19
G012335	0.27	0.02	3.78	0.26	0.47	0.10	1.42	0.09	0.42	0.01	0.11	0.02
G009321 (HOX9)	0.10	0.03	19.59	1.30	0.30	0.32	6.57	0.00	0.37	0.03	3.80	0.11
未処置			24.03	0.03			7.58	0.10			3.47	0.03

【０６１９】

２．３．ＰＨＨにおけるｓｇＲＮＡのスクリーニング

初代ヒト肝細胞（ＰＨＨ）を、実施例１に記載されるように、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡでトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクトから７２時間後に溶解し、ＮＧＳ分析を実施例１に記載されるように実施した。

【０６２０】

２つのプライマーセットについて表１のガイド配列を含むｓｇＲＮＡについて、編集率を決定した。２つのデータセットにおける各ガイドの平均編集率を表９Ａおよび図４Ａ～図４Ｂに示す。

【表４４】

表９Ａ初代ヒト肝細胞におけるＫＬＫＢ１編集データ

	セット１			セット２			
ガイドID	編集%	SD	N	ガイドID	編集%	SD	N
G013946*	49.9	2.2	2	G013946	50.8	9.1	2
G000644	49.3	5.7	2	G000644	44.7	3.7	2
G013945*	48.6	1.9	2	G013945*	50.3	1.6	2
G012102	48.1	4.4	2	G012102	45.8	0.3	2
G012320*	45	14	2	G012320*	41.9	15	2
G013938*	44.5	9.5	2	G013938	ND	NA	2
G009285	42.1	0.7	2	G009285	41.4	4.9	2
G009246	40.5	0.6	2	G009246	39.1	3.1	2
G000502	36.5	15	2	G000502	34.9	18	2
G000502	36.5	15	2	G000502	34.9	18.4	2
G012304*	36.2	3.3	2	G012304	ND	NA	2
G013886*	30.5	4	2	G013886*	37.2	0.8	2
G012325*	28.7	3.3	2	G012325*	33.9	0.9	2
G013896*	28.4	3.7	2	G013896*	28.7	1.2	2
G009321	27.7	10	2	G009321	26.9	11	2
G012323*	27.4	7.2	2	G012323*	30.6	6.5	2
G013925*	25.9	11	2	G013925*	28.7	12	2
G013922*	21	7	2	G013922*	19.3	3.3	2
G012327	20.5	2.3	2	G012327*	19.5	4.6	2
G012322	18.6	3.8	2	G012322	13.9	4.5	2
G009267	18.3	1.9	2	G009267	20.4	4.8	2
G013924*	17.4	9.3	2	G013924	ND	NA	2
G013943*	14.2	9.5	2	G013943*	12.1	6.1	2
G000645	13.5	3.2	2	G000645	9.1	4	2

G013895*	13.4	3.1	2	G013895	14	6.6	2
G013941*	13	4.8	2	G013941	14.3	2.6	2
G013882*	10.4	8.1	2	G013882	ND	NA	2
G012329*	9.8	0.7	2	G012329*	8.9	0.9	2
G012300*	9.7	1.8	2	G012300	ND	NA	2
G013899	9.3	0.2	2	G013899*	7.1	4.4	2
G013874	9	2.3	2	G013874*	9.5	3.6	2
G013931	8.9	1.6	2	G013931	ND	NA	2
G012315	8.8	5.4	2	G012315	ND	NA	2
G013902	6.2	3.9	2	G013902*	4.9	5.2	2
G013917	6.1	4.6	2	G013917*	7.1	6.5	2
G013916	5.6	0.6	2	G013916	4	0.8	2
G012324	5.2	2.9	2	G012324	4.8	3.9	2
G013912	5.1	2.9	2	G013912	4.6	1.1	2
G013913	4.8	0.4	2	G013913*	5	0.2	2
G013932	4.8	4.9	2	G013932	ND	NA	2
G013900	4.6	2.1	2	G013900	4.6	0.7	2
G012340	3.3	1.1	2	G012340	2.2	1.7	2
G013873	2.8	0.8	2	G013873	3.6	1.1	2
G013884	2.3	1.1	2	G013884	3	0.3	2
G013903	1.4	0.4	2	G013903	1.3	0.5	2
G013901	1.2	1.3	2	G013901	1.4	1.3	2
G013889	0.9	0.2	2	G013889	1.1	1.2	2
G013930	0.9	1.1	2	G013930	1.3	0.1	2
G013893	0.8	0.3	2	G013893	1.8	0.4	2
G013919	0.8	0.2	2	G013919	0.6	0.4	2
G013891	0.7	0.1	2	G013891	0.3	0	2
G013934	0.6	0.2	2	G013934	0.9	1.1	2
G013894	0.3	0.4	2	G013894	0.6	0.8	2
G013906	0.3	0	2	G013906	0.7	0.3	2
G013914	0.3	0.1	2	G013914	ND	NA	2

G013928	0.3	0.2	2	G013928	0.5	NA	2
G013875	0.2	0.1	2	G013875	0.3	0.1	2
G013878	0.2	0.1	2	G013878	0.3	0.1	2
G013880	0.2	0.1	2	G013880	0.1	0	2
G013939	0.2	0.2	2	G013939	0.2	0.1	2
G013942	0.2	0.1	2	G013942	0.2	0.1	2
G013870	0.1	0	2	G013870	0.1	0	2
G013871	0.1	0	2	G013871	0.1	0	2
G013883	0.1	0	2	G013883	0.6	0.4	2
G013897	0.1	0	2	G013897	0.1	0	2
G013927	0.1	0	2	G013927	0	0	2
G013929	0.1	0	2	G013929	ND	NA	2
G013935	0.1	0.1	2	G013935	0.1	0	2
G013936	0.1	0	2	G013936	0.1	0	2
G013940	0.1	0	2	G013940	0.1	0.1	2
G013921	ND	ND	2	G013921	0.3	0.2	2
G013926	ND	ND	2	G013926	0.2	0.1	2

＊「選択されたｓｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【０６２１】

２．３．１　ＰＣＨにおけるｓｇＲＮＡのスクリーニング

初代カニクイザル肝細胞（ＰＣＨ）を、用量応答性効果をアッセイするために調製されたリポフェクション試料の量を増加させることを使用して、実施例１に記載されるようにＣａｓ９　ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡでトランスフェクトした。細胞を、トランスフェクトから７２後に溶解し、ＮＧＳ分析を実施例１に記載されるように実施した。増幅およびインデルの検出のために２つのプライマーセットを使用して、表１のガイド配列を含むｓｇＲＮＡについて、編集率を決定した。２つのデータセットにおける各ガイドの平均編集率を表９Ｂおよび図４Ｃ～４Ｄに示す。

【０６２２】

セット１および２からの選択したガイドＲＮＡおよび対応する編集データは、表９Ｂにおいて、アスタリスク（＊）を付されている。比較した場合、データセットは、高度に相関関係にあると決定された（Ｓｐｅａｒｍａｎ　Ｒ＝０．９８７）。

【表４５】

表９Ｂ．初代カニクイザル肝細胞におけるＫＬＫＢ１編集データ

	セット１			セット２		
ガイドID	編集%	SD	N	編集%	SD	N
G013923	4.3	0	2	5	0.6	2
G013877	1.5	0	2	1.3	0.2	2
G013884	0.4	0	2	0.2	0.1	2
G013929	0.3	0	2	0.5	0.1	2
G013940	0.2	0	2	0.3	0.1	2
G013915	0.1	0	2	0.2	ND	2
G013939	9.3	0.1	2	10.1	0.3	2
G013870	4.8	0.1	2	4	1	2
G013879	3.4	0.1	2	3.1	0.6	2
G012327	1.4	0.1	2	1.5	0.1	2
G013942	0.7	0.1	2	0.2	ND	2
G013883	0.3	0.1	2	0.2	0.1	2
G013926	0.1	0.1	2	0	0	2
G013887	0.9	0.2	2	0.7	0.7	2
G013930	3.1	0.3	2	3.2	1.3	2
G013902	0.9	0.3	2	0.7	0.4	2
G013903	0.7	0.3	2	0.9	0.1	2
G013875	6.8	0.4	2	5.6	0.2	2
G013881	5.8	0.4	2	5.7	0	2
G013914	1.4	0.4	2	ND	ND	2
G013936	8.2	0.6	2	8.1	1.3	2
G013916	7.1	0.6	2	6.4	1.9	2
G013874	6.9	0.6	2	6	0.4	2
G012340	3.6	0.6	2	3.7	0.9	2
G013880	1.9	0.6	2	1.9	0.1	2
G013919	0.9	0.6	2	0.7	0.4	2
G013878*	14.3	0.7	2	11.8	3	2
G013931	4	0.8	2	ND	ND	2
G013872	11.1	0.9	2	11.7	1	2
G013909	4.8	0.9	2	5.3	0.5	2
G013899	3	0.9	2	3	1.6	2

G013886*	15.4	1.1	2	15.2	0.4	2
G013944	2.1	1.1	2	2.3	0.5	2
G013876*	23.4	1.3	2	21.4	3.3	2
G013921	4.1	1.3	2	3.1	3.3	2
G013913*	12.1	1.5	2	11.8	ND	2
G013871*	25.9	1.6	2	23.9	4	2
G013904	9	1.6	2	10.4	2.3	2
G013906	3.2	1.6	2	3.3	1.9	2
G013928	4.6	1.7	2	4.1	1.6	2
G012324	3.9	1.8	2	4.4	2.4	2
G013910	3.9	1.8	2	4.8	1.8	2
G013892	2.7	1.8	2	2.8	1.8	2
G013943	3.1	2	2	3.7	2.3	2
G013920	2	2	2	2.9	1.4	2
G013889*	29.4	2.1	2	31.4	0.5	2
G013938*	24.9	2.1	2	24.2	0.6	2
G012329*	12.4	2.1	2	11.4	0.5	2
G012315	4.1	2.1	2	ND	ND	2
G013927	4	2.1	2	5.2	0.3	2
G013918	2.3	2.1	2	2	1.6	2
G013935	4.1	2.2	2	4.3	1.1	2
G013941	7	2.3	2	8.7	1.3	2
G012322	10.8	2.4	2	10.4	3.4	2
G013890	4.9	2.5	2	5.5	2.1	2
G013925	5.8	2.6	2	6.9	2.3	2
G012325*	11.8	2.8	2	11.6	3.4	2
G013888	6.7	2.8	2	7.1	1.6	2
G013897	11	3	2	11.9	1.6	2
G013900	6.6	3	2	7.7	4.2	2
G013917*	16.4	3.2	2	18.3	3.8	2
G013937*	30.4	3.8	2	26.5	6	2
G013932	5.6	4.4	2	ND	ND	2
G012304*	11.7	4.7	2	ND	ND	2
G013895	6.8	4.7	2	6	3.2	2
G013896*	11.5	5	2	10.3	3.8	2

G013907*	36.1	5.5	2	36.2	5.7	2
G012320	8.9	5.7	2	9.2	4.6	2
G013945*	19	6.6	2	20	6.1	2
G013924*	13.9	6.7	2	ND	ND	2
G013882*	24.7	9	2	ND	ND	2
G013946*	27.2	ND	2	22.4	4.2	2
G013873*	23.6	ND	2	20.1	2.9	2
G012323*	12.3	ND	2	11.8	1.5	2
G013934	8.3	ND	2	7.1	1.6	2
G013905	6	ND	2	4	3.3	2
G013898	5.7	ND	2	6	2.1	2
G013908	1.8	ND	2	3.6	1.3	2
G013911	1.8	ND	2	3.4	1.6	2
G013894	0.3	ND	2	0.2	0.1	2
G013885	ND	ND	2	5.9	0.2	2
G013891	ND	ND	2	3.3	0.7	2
G013893	ND	ND	2	1.2	0.9	2
G013901	ND	ND	2	42.2	4.2	2
G013912	ND	ND	2	0.4	ND	2
G013922	ND	ND	2	11.2	1.1	2
G013933	ND	ND	2	12.2	4	2

＊「選択されたｓｇＲＮＡ」、試験したガイドＲＮＡのサブセット

【０６２３】

実施例３：用量応答アッセイ

３．１　４点用量応答アッセイにおける、ＰＣＨおよびＰＨＨのｓｇＲＮＡの交差スクリーニング

ヒトＫＬＫＢ１を標的とする修飾ｓｇＲＮＡおよびカニクイザルとマッチしたｓｇＲＮＡ配列を、実施例２．２に記載のＰＨＨガイドスクリーニングからの１６個のガイドを使用して、用量応答アッセイにおいて、ＰＨＨおよびＰＣＨにおいて試験した。Ｃａｓ９ｍＲＮＡおよびｓｇＲＮＡを含むリポフェクション試料を、実施例２．２に記載されるように調製した。初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、実施例１に記載されるようにプレーティングした。リポフェクション試料で治療する前に、両方の細胞株を３７℃、５％ＣＯ２で４８時間インキュベートした。リポフェクション試料を、３％のＦＢＳを含有するＣｅｌｌａｒｔｉｓ　Ｐｏｗｅｒ　Ｐｒｉｍａｒｙ　ＨＥＰ　Ｍｅｄｉｕｍ（Ｔａｋａｄａ、カタログ番号Ｙ２００２０）中、３７℃で１０分間インキュベートした。

【０６２４】

インキュベーション後、４点用量応答アッセイにおいて、リポフェクション試料をヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。ＰＨＨを、トランスフェクトから１２０時間後に溶解し、ＰＣＨを、トランスフェクトから１６８時間後に溶解し、ｇＤＮＡを、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために定量ＰＣＲに供した。

【０６２５】

ＰＨＨ細胞における濃度０．４ｎＭ、３．３ｎＭ、３０ｎＭ、および９０ｎＭでのｓｇＲＮＡのインデル頻度を表１０および図５Ａ～５Ｂに示す。ＥＬＩＳＡによって決定されたｓｇＲＮＡの分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを表１０および図５Ｃ～５Ｄに示す。

【表４６】

表１０：ＰＨＨにおけるＫＬＫＢ１編集データおよび分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベル

ガイドID	ガイド濃度(nM)	平均インデル頻度	SD	平均分泌 KLKB1	SD
G012253	90	0.54	0.04	5.84	0.29
	30	0.64	0.05	4.06	0.09
	3.3	0.31	0.01	17.29	0.35
	0.4	0.02	0.00	26.56	0.00
G012259	90	0.30	0.02	8.70	0.10
	30	0.52	0.06	4.90	0.00
	3.3	0.20	0.03	18.90	0.20
	0.4	0.02	0.00	26.60	0.00
G012260	90	0.73	0.04	2.20	0.00
	30	0.84	0.00	0.30	0.30
	3.3	0.71	0.02	4.00	0.20
	0.4	0.20	0.01	25.10	0.30
G012267	90	0.80	0.03	2.10	0.10
	30	0.89	0.01	0.30	0.00
	3.3	0.76	0.05	4.00	0.20
	0.4	0.29	0.03	20.70	0.20
G012278	90	0.47	0.10	4.80	0.10
	30	0.57	0.02	1.80	0.10
	3.3	0.24	0.02	10.80	0.10
	0.4	0.02	0.01	26.50	0.10
G012279	90	0.00	0.00	18.70	0.40
	30	0.00	0.00	21.10	0.30
	3.3	0.00	0.00	26.60	0.00
	0.4	0.00	0.00	26.60	0.00
G012280	90	0.42	0.08	6.90	0.10
	30	0.69	0.01	4.70	0.10
	3.3	0.21	0.00	23.30	0.10
	0.4	0.01	0.00	26.60	0.00
G012293	90	0.48	0.05	5.10	0.10
	30	0.70	0.00	4.20	0.00
	3.3	0.32	0.02	15.20	0.60

	0.4	0.03	0.00	26.60	0.00
G012294	90	0.39	0.08	7.37	0.08
	30	0.48	0.04	6.44	0.06
	3.3	0.13	0.01	22.57	0.25
	0.4	0.01	0.00	23.49	0.73
G012298	90	0.48	0.14	9.30	0.60
	30	0.52	0.00	6.20	0.10
	3.3	0.20	0.07	21.50	0.50
	0.4	0.01	0.00	25.50	0.50
G012303	90	0.68	0.05	6.00	0.00
	30	0.75	0.04	3.80	0.30
	3.3	0.43	0.03	15.80	0.20
	0.4	0.02	0.00	23.20	2.70
G012304	90	0.54	0.02	6.00	0.10
	30	0.52	0.02	7.20	0.20
	3.3	0.21	0.04	21.30	0.30
	0.4	0.01	0.00	25.60	0.00
G012305	90	0.61	0.03	7.90	0.00
	30	0.66	0.01	4.40	0.10
	3.3	0.33	0.01	18.00	0.00
	0.4	0.01	0.00	26.10	0.20
G012308	90	0.41	0.01	10.70	0.20
	30	0.42	0.10	9.10	0.10
	3.3	0.08	0.01	24.30	0.10
	0.4	0.01	0.00	26.60	0.00
G012321	90	0.43	0.00	9.70	0.10
	30	0.61	0.13	5.20	0.00
	3.3	0.17	0.01	21.70	0.20
	0.4	0.02	0.02	26.50	0.10
G012323	90	0.28	0.03	9.90	0.30
	30	0.28	0.10	7.60	0.10
	3.3	0.14	0.03	22.40	0.30
	0.4	0.01	0.00	26.60	0.00
未処理	NA			22.61	0.21

【０６２６】

ＰＣＨ細胞中の濃度０．４ｎＭ、１０ｎＭ、３０ｎＭ、および９０ｎＭでのｓｇＲＮＡのインデル頻度を表１１および図５Ｅ～図５Ｆに示す。ＥＬＩＳＡによって決定されるｓｇＲＮＡの分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを表１１および図５Ｇ～図５Ｈに示す。

【表４７】

表１１：ＰＣＨにおけるＫＬＫＢ１編集データおよび分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベル

ガイド	ガイド濃度 (nM)	平均インデル頻度	SD	平均分泌 KLKB1	SD
G012253	90	0.25	0.01	0.82	0.01
	30	0.38	0.05	0.77	0.00
	10	2.76	0.09	0.44	0.07
	0.4	13.26	0.32	0.01	0.00
G012259	90	1.13	0.02	0.70	0.01
	30	0.81	0.12	0.69	0.01
	10	3.95	0.41	0.37	0.04
	0.4	12.88	0.96	0.00	0.00
G012260	90	0.36	0.02	0.82	0.02
	30	0.23	0.00	0.81	0.01
	10	1.56	0.13	0.56	0.06
	0.4	11.51	1.03	0.01	0.00
G012267	90	1.28	0.10	0.67	0.02
	30	0.98	0.07	0.67	0.00
	10	3.18	0.37	0.42	0.04
	0.4	11.88	0.28	0.01	0.00
G012278	90	1.01	0.06	0.61	0.03
	30	0.82	0.01	0.63	0.02
	10	3.16	0.19	0.30	0.05
	0.4	12.08	1.14	0.00	0.00
G012279	90	9.88	1.25	0.00	0.00
	30	9.44	1.07	0.00	0.00
	10	12.49	0.14	0.00	0.00
	0.4	12.12	0.25	0.00	0.00
G012280	90	4.32	0.20	0.44	0.02
	30	3.08	0.18	0.46	0.00
	10	7.70	0.21	0.13	0.02
	0.4	11.69	1.13	0.00	0.00
G012293	90	0.80	0.22	0.80	0.03
	30	0.54	0.09	0.80	0.02
	10	2.56	0.16	0.59	0.00

	0.4	11.79	0.23	0.01	0.00
G012294	90	6.96	0.48	0.39	0.09
	30	6.21	0.29	0.41	0.03
	10	15.19	1.13	0.12	0.00
	0.4	24.96	3.85	0.00	0.00
G012298	90	18.40	0.36	ND	ND
	30	25.03	2.87	ND	ND
	10	24.81	2.89	ND	ND
	0.4	23.59	3.91	ND	ND
G012303	90	18.34	4.33	0.16	0.06
	30	16.05	4.43	0.17	0.00
	10	26.04	3.42	0.03	0.00
	0.4	27.82	2.74	0.00	0.00
G012304	90	5.75	1.35	0.52	0.04
	30	6.14	0.68	0.54	0.01
	10	17.23	1.75	0.21	0.04
	0.4	24.90	0.95	0.00	0.00
G012305	90	19.27	4.43	0.07	0.02
	30	18.57	3.56	0.11	0.01
	10	22.11	2.31	0.02	0.00
	0.4	27.30	1.17	0.00	0.00
G012308	90	6.97	2.00	0.44	0.04
	30	7.52	0.00	0.49	0.03
	10	14.43	0.07	0.18	0.05
	0.4	22.80	2.56	0.00	0.00
G012321	90	4.95	1.25	ND	ND
	30	5.96	0.07	ND	ND
	10	10.71	0.16	ND	ND
	0.4	23.83	1.78	ND	ND
G012323	90	9.93	2.24	ND	ND
	30	8.97	3.13	ND	ND
	10	15.75	0.20	ND	ND
	0.4	22.16	0.27	ND	ND

【０６２７】

インデル頻度および分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルは、図５Ｉ～５Ｊに示されるように、ＰＨＨおよびＰＣＨの両方において逆相関することが示された。

【０６２８】

３．２　７点用量応答アッセイにおける、ＰＨＨおよびＰＣＨのｓｇＲＮＡの交差スクリーニング

用量応答アッセイにおいて、ヒトＫＬＫＢ１　ｓｇＲＮＡ配列を標的とするｓｇＲＮＡの脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤をＰＨＨおよびＰＣＨにおいて試験した。

【０６２９】

ＬＮＰを実施例１に記載のように製剤化した。最終ＬＮＰを、上述の分析方法に従って、カプセル化効率、多分散指数、および平均粒径を決定するために特徴付けた。

【０６３０】

初代ヒトおよびカニクイザル肝細胞を、実施例１に記載されるようにプレーティングした。ＬＮＰで治療する前に、両方の細胞株を３７℃、５％ＣＯ２で２４時間インキュベートした。ＬＮＰを、３％ＦＢＳを含有する培地中、３７℃で１０分間インキュベートした。インキュベーション後、ＬＮＰを、７点の３倍用量応答曲線において、ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。細胞を、トランスフェクトから７２時間後に溶解し、ｇＤＮＡを、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために定量ＰＣＲに供した。

【０６３１】

濃度０．０４ｎＭ、０．１３ｎＭ、０．４０ｎＭ、１．１９ｎＭ、３．５８ｎＭ、１０．７５ｎＭ、および３２．２５ｎＭでのｓｇＲＮＡのインデル頻度を表１２に示し、ＰＨＨについては図６Ａ～図６Ｂ、ＰＣＨについては図６Ｃ～図６Ｄに対応する用量応答曲線を示す。

【表４８】

表１２：インビトロでＫＬＫＢ１を標的とするＬＮＰについてのインデル頻度および分泌ＫＬＫＢ１タンパク質

ガイドID	ガイド濃度(nM)	PHH				PCH			
		平均インデル頻度	SD	平均分泌KLKB1	SD	平均インデル頻度	SD	平均分泌KLKB1	SD
G012253	32.25	0.91	0.00	-1.38	0.22	0.90	0.01	-1.58	0.10
	10.75	0.89	0.00	-1.30	0.08	0.89	0.01	-1.57	0.07
	3.58	0.89	0.02	-1.23	0.19	0.84	0.00	-1.39	0.07
	1.19	0.83	0.01	-0.48	0.11	0.55	0.03	5.01	0.24
	0.40	0.64	0.04	2.49	0.07	0.18	0.02	22.35	0.29
	0.13	0.34	0.03	9.34	0.01	0.05	0.01	27.18	0.07
	0.04	0.12	0.01	15.04	0.17	0.01	0.00	27.18	0.07
G012259	32.25	0.84	0.01	-1.12	0.21	0.95	0.01	-1.57	0.07
	10.75	0.86	0.01	-1.17	0.11	0.93	0.01	-1.57	0.02
	3.58	0.85	0.02	-1.00	0.06	0.80	0.00	-0.71	0.70
	1.19	0.79	0.01	-0.28	0.04	0.44	0.04	8.93	0.23
	0.40	0.63	0.02	2.37	0.19	0.12	0.03	25.94	0.05
	0.13	0.36	0.03	8.32	0.31	0.01	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.13	0.01	12.97	0.41	0.00	0.00	27.18	0.07
G012260	32.25	0.93	0.00	-1.36	0.21	0.96	0.00	-1.32	0.18
	10.75	0.92	0.01	-1.35	0.15	0.95	0.01	-1.41	0.37
	3.58	0.92	0.01	-1.43	0.19	0.87	0.02	-0.94	0.03
	1.19	0.92	0.01	-1.37	0.27	0.50	0.00	7.33	0.02
	0.40	0.90	0.00	-1.03	0.17	0.13	0.01	24.00	1.03
	0.13	0.84	0.02	0.30	0.03	0.03	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.63	0.03	4.51	0.20	0.00	0.00	26.95	0.39
G012267	32.25	0.94	0.03	-1.58	0.13	0.95	0.02	-1.88	0.02
	10.75	0.94	0.01	-1.50	0.08	0.94	0.02	-1.94	0.02
	3.58	0.93	0.01	-1.57	0.13	0.84	0.00	-1.48	0.10
	1.19	0.91	0.05	-1.62	0.25	0.52	0.01	7.68	0.29
	0.40	0.91	0.01	-1.48	0.22	0.15	0.01	24.74	1.33
	0.13	0.87	0.01	-0.77	0.07	0.04	0.01	27.00	0.05
	0.04	0.78	0.02	1.28	0.07	0.01	0.00	27.00	0.05

G012278	32.25	0.95	0.00	-1.63	0.18	0.95	0.01	-1.87	0.04
	10.75	0.94	0.01	-1.64	0.10	0.94	0.01	-1.91	0.14
	3.58	0.94	0.00	-1.59	0.05	0.82	0.02	-1.41	0.16
	1.19	0.88	0.01	-1.38	0.20	0.44	0.01	8.23	0.17
	0.40	0.65	0.03	0.29	0.14	0.08	0.03	26.13	1.19
	0.13	0.34	0.02	5.68	0.20	0.02	0.00	27.00	0.05
	0.04	0.12	0.01	12.54	0.43	0.01	0.00	27.00	0.05
G012279	32.25	0.00	0.00	-0.99	0.39	0.00	0.00	0.02	0.11
	10.75	0.00	0.00	-0.56	0.05	0.00	0.00	8.49	0.34
	3.58	0.00	0.00	3.54	0.08	0.00	0.00	26.50	0.03
	1.19	0.00	0.00	12.69	0.56	0.00	0.00	27.00	0.05
	0.40	0.00	0.00	15.91	0.26	0.00	0.00	26.85	0.17
	0.13	0.00	0.00	17.60	0.18	0.00	0.00	27.00	0.05
	0.04	0.00	0.00	17.32	0.00	0.00	0.00	27.00	0.05
G012280	32.25	0.93	0.01	-1.68	0.27	0.87	0.01	-1.91	0.01
	10.75	0.90	0.03	-1.56	0.20	0.83	0.01	-1.62	0.30
	3.58	0.91	0.03	-1.55	0.11	0.56	0.02	2.88	0.53
	1.19	0.85	0.01	-0.61	0.27	0.15	0.00	21.86	0.24
	0.40	0.61	0.02	4.05	0.45	0.02	0.00	26.36	0.86
	0.13	0.26	0.01	11.55	0.19	0.01	0.00	27.00	0.05
	0.04	0.08	0.00	15.47	0.38	0.00	0.00	27.00	0.05
G012293	32.25	0.91	0.00	-1.79	0.18	0.98	0.00	-1.82	0.06
	10.75	0.91	0.01	-1.63	0.19	0.96	0.02	-1.84	0.02
	3.58	0.92	0.02	-1.65	0.27	0.90	0.00	-1.21	0.55
	1.19	0.89	0.00	-1.27	0.55	0.54	0.02	3.40	0.13
	0.40	0.82	0.02	-0.36	0.32	0.19	0.02	22.12	0.61
	0.13	0.60	0.00	3.31	0.19	0.04	0.02	26.91	0.09
	0.04	0.32	0.01	10.09	0.50	0.01	0.00	27.00	0.04
G012294	32.25	0.93	0.01	-1.58	0.28	0.90	0.02	-1.84	0.12
	10.75	0.91	0.01	-1.41	0.14	0.89	0.00	-1.86	0.04
	3.58	0.91	0.01	-1.46	0.23	0.60	0.00	-0.15	0.19
	1.19	0.82	0.02	-0.96	0.32	0.23	0.03	13.68	0.43
	0.40	0.60	0.03	1.61	0.43	0.07	0.03	25.94	1.04
	0.13	0.30	0.01	7.91	0.02	0.01	0.00	26.73	0.16
	0.04	0.12	0.00	12.18	1.01	0.01	0.00	27.00	0.05

	32.25	0.95	0.00	-0.50	0.11	NA	NA	15.77	0.15
	10.75	0.95	0.00	-0.47	0.23	NA	NA	27.00	0.05
	3.58	0.91	0.00	-0.15	0.21	NA	NA	27.00	0.05
G012298	1.19	0.83	0.01	0.88	0.40	NA	NA	27.00	0.05
	0.40	0.59	0.01	6.54	0.52	NA	NA	26.39	0.82
	0.13	0.24	0.02	12.35	0.21	NA	NA	27.00	0.05
	0.04	0.08	0.00	16.29	1.12	NA	NA	27.00	0.05
	32.25	0.96	0.01	-1.27	0.14	0.88	0.01	-1.55	0.10
	10.75	0.94	0.00	-1.39	0.18	0.83	0.02	-1.36	0.12
	3.58	0.93	0.01	-1.28	0.15	0.40	0.02	8.20	0.71
G012303	1.19	0.90	0.01	-0.60	0.18	0.08	0.01	26.23	0.95
	0.40	0.74	0.02	2.18	0.05	0.02	0.00	27.18	0.07
	0.13	0.36	0.01	9.45	0.14	0.00	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.13	0.01	15.14	0.26	0.00	0.00	27.18	0.07
	32.25	0.94	0.01	-1.37	0.32	0.96	0.00	-1.70	0.19
	10.75	0.95	0.01	-1.39	0.10	0.94	0.01	-1.72	0.08
	3.58	0.91	0.00	-1.41	0.21	0.87	0.00	-1.52	0.01
G012304	1.19	0.84	0.02	-0.38	0.15	0.52	0.02	6.62	0.71
	0.40	0.61	0.02	3.74	0.19	0.13	0.02	25.35	1.70
	0.13	0.22	0.01	11.39	0.18	0.02	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.06	0.00	15.41	0.72	0.00	0.00	27.18	0.07
	32.25	0.95	0.01	-1.26	0.16	0.86	0.01	-1.53	0.11
	10.75	0.94	0.00	-1.37	0.13	0.75	0.02	-0.43	0.12
	3.58	0.92	0.02	-1.30	0.15	0.33	0.01	15.42	0.72
G012305	1.19	0.86	0.01	-0.26	0.07	0.06	0.00	27.18	0.07
	0.40	0.65	0.03	3.85	0.04	0.01	0.00	27.18	0.07
	0.13	0.27	0.04	10.94	0.24	0.00	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.08	0.01	15.12	0.54	0.00	0.00	27.18	0.07
	32.25	0.95	0.01	-1.07	0.19	0.93	0.02	-1.66	0.12
	10.75	0.95	0.01	-0.92	0.07	0.92	0.01	-1.44	0.02
	3.58	0.88	0.02	-0.77	0.27	0.60	0.07	-0.18	0.32
G012308	1.19	0.75	0.01	1.00	0.10	0.34	0.03	14.44	0.04
	0.40	0.31	0.05	7.89	0.27	0.08	0.02	26.77	0.64
	0.13	0.07	0.00	12.76	0.59	0.03	0.02	27.18	0.07
	0.04	0.02	0.01	14.75	0.43	0.00	0.00	27.17	0.05

G012321	32.25	0.93	0.00	-1.17	0.24	0.96	0.01	-1.68	0.19
	10.75	0.93	0.01	-1.26	0.14	0.92	0.02	-1.60	0.12
	3.58	0.88	0.02	-1.07	0.21	0.80	0.02	-0.84	0.10
	1.19	0.85	0.00	-0.17	0.17	0.40	0.02	14.33	0.57
	0.40	0.63	0.02	3.56	0.06	0.09	0.01	23.98	1.24
	0.13	0.25	0.03	10.27	0.82	0.03	0.02	27.17	0.05
	0.04	0.09	0.01	13.27	0.79	0.01	0.00	27.18	0.07
G012323	32.25	0.89	0.01	-1.17	0.28	0.93	0.00	-1.74	0.12
	10.75	0.90	0.00	-1.35	0.14	0.93	0.00	-1.72	0.03
	3.58	0.84	0.01	-1.14	0.17	0.76	0.54	-0.36	0.32
	1.19	0.73	0.01	0.20	0.14	0.35	0.01	15.43	0.17
	0.40	0.49	0.01	4.28	0.04	0.07	0.01	25.63	1.00
	0.13	0.23	0.02	10.12	1.03	0.01	0.00	27.18	0.07
	0.04	0.08	0.01	14.08	0.80	0.00	0.00	27.18	0.07
G013901	32.25	0.29	0.01	7.11	0.34	0.97	0.00	-1.58	0.48
	10.75	0.29	0.00	8.89	0.40	0.98	0.00	-1.76	0.26
	3.58	0.22	0.02	10.94	0.34	0.95	0.01	-1.81	0.19
	1.19	0.15	0.02	14.44	0.70	0.79	0.01	-0.82	0.32
	0.40	0.08	0.01	13.76	0.22	0.46	0.00	8.67	0.27
	0.13	0.05	0.00	14.80	0.40	0.19	0.01	21.35	0.16
	0.04	0.02	0.00	14.97	0.59	0.05	0.00	26.84	0.19
未処理	NA	0.00	0.00	13.62	0.95	0.00	0.00	25.77	2.09

【０６３２】

３．３　７点用量応答アッセイにおける、ＰＣＨおよびＰＨＨのリードｓｇＲＮＡの交差スクリーニング

用量応答アッセイにおいて、修飾ｓｇＲＮＡの脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）製剤をＰＨＨおよびＰＣＨにおいて試験した。

【０６３３】

この試験では、実施例３．２に記載されるＬＮＰを使用した。

【０６３４】

インキュベーション後、ＬＮＰを、７点の３倍用量応答曲線において、ヒトまたはカニクイザル肝細胞に添加した。細胞を、トランスフェクトから７２時間後に溶解し、ｇＤＮＡを、実施例１に記載されるようにＮＧＳ分析のために定量ＰＣＲに供した。ＫＬＫＢ１タンパク質分析のために、細胞を、トランスフェクション後８日目に溶解し、全細胞抽出物を実施例１に記載されるようにウエスタンブロッティング分析に供した。

【０６３５】

ＰＨＨおよびＰＣＨについての濃度０．０４ｎＭ、０．１３ｎＭ、０．４０ｎＭ、１．１９ｎＭ、３．５８ｎＭ、１０．７５ｎＭ、および３２．２５ｎＭでのｓｇＲＮＡのインデル頻度を表１３に示し、用量応答曲線データを図７Ａおよび図７Ｂに示す。ＥＬＩＳＡによって決定されるｓｇＲＮＡの分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベルを、ＰＨＨについては表１３および図７Ｃに、ＰＣＨについては図７Ｄに示す。

【表４９】

表１３．インビトロでＫＬＫＢ１を標的とするＬＮＰについてのインデル頻度および分泌ＫＬＫＢ１タンパク質

	PHH					PCH				
ガイドID	ガイド濃度(nM)	平均インデル頻度	SD	平均分泌KLKB1	SD	ガイド濃度(nM)	平均インデル頻度	SD	平均分泌KLKB1	SD
G012260	32.25	0.88	0.03	-0.07	0.04	32.25	0.97	0.01	-1.42	0.04
	10.75	0.86	0.03	0.05	0.09	10.75	0.98	0.01	-1.32	0.03
	3.58	0.82	0.08	0.03	0.04	3.58	0.95	0.00	-1.41	0.04
	1.19	0.81	0.07	0.06	0.00	1.19	0.68	0.07	-0.08	0.03
	0.40	0.84	0.00	0.14	0.00	0.40	0.26	0.04	14.46	1.24
	0.13	0.79	0.04	0.55	0.01	0.13	0.06	0.01	24.37	0.74
	0.04	0.73	0.02	1.80	0.01	0.04	0.01	0.00	25.32	0.79
G012267	32.25	0.88	0.05	0.11	0.02	32.25	0.98	0.00	-1.46	0.01
	10.75	0.89	0.04	0.17	0.01	10.75	0.97	0.02	-1.28	0.14
	3.58	0.87	0.05	0.16	0.05	3.58	0.94	0.00	-1.36	0.08
	1.19	0.89	0.04	0.12	0.02	1.19	0.61	0.01	1.06	0.00
	0.40	0.86	0.02	0.23	0.02	0.40	0.20	0.03	15.86	0.74
	0.13	0.87	0.02	0.54	0.00	0.13	0.05	0.00	25.73	1.85
	0.04	0.80	0.03	1.54	0.06	0.04	0.02	0.00	26.39	0.16
G012293	32.25	0.85	0.00	-0.09	0.07	32.25	0.98	0.01	-1.43	0.02
	10.75	0.76	0.15	-0.04	0.01	10.75	0.98	0.01	-1.32	0.06
	3.58	0.78	0.02	0.06	0.08	3.58	0.98	0.00	-1.37	0.07
	1.19	0.85	0.06	0.39	0.30	1.19	0.81	0.01	-0.89	0.04
	0.40	0.74	0.08	0.71	0.01	0.40	0.35	0.03	9.93	0.49
	0.13	0.71	0.02	2.52	0.12	0.13	0.09	0.00	23.26	0.06
	0.04	0.45	0.03	7.55	0.09	0.04	0.02	0.00	25.17	0.05
G013901	32.25	0.31	0.07	9.02	0.05	32.25	0.98	0.00	-1.47	0.02
	10.75	0.31	0.02	8.64	0.30	10.75	0.98	0.00	-1.35	0.04
	3.58	0.26	0.03	11.28	0.62	3.58	0.98	0.00	-1.45	0.03
	1.19	0.19	0.01	12.75	0.42	1.19	0.89	0.02	-1.32	0.09
	0.40	0.13	0.02	15.06	0.73	0.40	0.58	0.05	2.65	0.28
	0.13	0.06	0.01	15.61	1.11	0.13	0.23	0.05	15.10	0.22
	0.04	0.04	0.00	16.27	0.46	0.04	0.08	0.00	23.21	0.82
未処理	NA	0.00	0.00	18.29	1.14	NA	0.00	0.00	25.96	1.35

【０６３６】

ＫＬＫＢ１タンパク質分析のために、ＰＨＨをヒトＫＬＫＢ１ガイドＧ０１２２６７でトランスフェクトし、トランスフェクション後８日目に溶解し、全細胞抽出物を実施例１に記載されるようにウエスタンブロッティング分析に供した。７点用量応答曲線にわたるヒトＫＬＫＢ１タンパク質レベルを未治療対照と比較し、ＧＡＰＤＨに対して正規化し、図７Ｅに示す。

【０６３７】

実施例４－ＫＬＫＢ１ガイドのオフターゲット分析

実施例１に記載の生化学的方法を使用して、ＫＬＫＢ１を標的とするＣａｓ９によって

切断される潜在的なオフターゲットゲノム部位を決定した。上述の実験の結果に基づいて選択されたガイドを、潜在的なオフターゲットゲノム切断部位について試験した。１６ｎＭの濃度で、ＨＥＫ２９３細胞からのゲノムＤＮＡに対するオフターゲットゲノム切断について、１６個のＫＬＫＢ１標的化ガイドを評価した（ＡＴＣＣ、カタログ番号ＣＲＬ－１５７３）。ＫＬＫＢ１ガイドＧ０１２２６７、および既知のオフターゲットプロファイルを有する対照ガイドが、実験に含まれていた（２８１個のオフターゲット部位が検出されたＥＭＸ１を標的とするＧ０００６４４、６６０２個のオフターゲット部位が検出されたＶＥＧＦＡを標的とするＧ０００４５）。Ｆｒｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｔｓａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５）は、６４ｎＭ濃度でプールしたヒトＰＢＭＣ由来のゲノムＤＮＡに対するオフターゲットゲノム切断について評価した。ＨＥＫ２９３細胞由来のゲノムＤＮＡを用いた生化学アッセイにおいて検出された潜在的なオフターゲット部位の数を表１４Ａに示す。ＰＢＭＣ由来のゲノムＤＮＡを用いた生化学アッセイにおいて検出された潜在的なオフターゲット部位の数を表１４Ｂに示す。ＥＭＸ１ガイドおよびＶＥＧＦＡガイドについての文献に記載されているオフターゲット部位の数と比較して、本明細書で実施されるアッセイによって検出されるオフターゲット部位の率が示される。

【表５０】

表１４Ａ．ＨＥＫ２９３細胞ゲノムＤＮＡによる生化学的オフターゲット解析

ガイドID	標的	ガイド濃度(nM)	オフターゲット部位
G012253	KLKB1	16	122
G012259	KLKB1	16	77
G012260	KLKB1	16	153
G012267	KLKB1	16	136
G012278	KLKB1	16	153
G012279	KLKB1	16	0
G012280	KLKB1	16	292
G012293	KLKB1	16	126
G012294	KLKB1	16	132
G012298	KLKB1	16	155
G012303	KLKB1	16	45
G012304	KLKB1	16	42
G012305	KLKB1	16	48
G012308	KLKB1	16	116
G012321	KLKB1	16	107
G012323	KLKB1	16	14

表１４Ｂ．ヒトＰＢＭＣゲノムＤＮＡによる生化学的オフターゲット分析

ガイド	標的	オフターゲット部位(率*)
G012267	KLKB1	61
G000644	EMX1	242/281(86%)
G000645	VEGFA	4431/6602(67%)

＊率は、各ガイド標的部位についての既知のオフターゲット部位の数に対するものである。

【０６３８】

実施例５．潜在的なオフターゲット部位を検証するための標的シークエンシング

ＫＬＫＢ１ガイドは、さらなる評価のために上の実験に基づいて選択された。実施例１に記載の標的オフターゲットアプローチを使用して、これらのガイドに関連する潜在的なオフターゲットについての標的インデル活性を評価した。この実験で試験したオフターゲット部位を、実施例４に記載の生化学アッセイ実験または実施例１に記載のインシリコ予測を介して特定した。

【０６３９】

この実験では、ヒトＫＬＫＢ１を標的とする３つのｓｇＲＮＡを評価した。ＰＨＨを培養し、実施例１に記載されるようにＣａｓ９　ｍＲＮＡおよび目的のｓｇＲＮＡ（例えば、評価のための潜在的なオフターゲット部位を有するｓｇＲＮＡ）を含むＬＮＰでトランスフェクトした。ゲノムＤＮＡをＰＨＨから単離し、実施例１に記載されるようにＮＧＳ

および標的オフターゲット分析に供した。

【０６４０】

アッセイで評価した潜在的なオフターゲット部位の数、およびそれらの部位、アッセイによって成功裏に特性決定されたオフターゲット、続いて手動検査によって検証した部位の数を表１５Ａに示す。

【表５１】

表１５．標的オフターゲット分析

ガイドID	評価されたオフターゲット	特性決定されたオフターゲット	検証されたオフターゲット
G012260	223	206	5
G012267	181	171	1
G012293	360	347	4

【０６４１】

実施例６．Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおけるヒト化ＫＬＫＢ１遺伝子座のインビボ編集

この試験において、ヒトＫＬＫＢ１タンパク質を発現するヒト化マウス（Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデル）を使用した。Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルは、マウスＫＬＫＢ１の開始コドンから停止コドンまでの領域が、対応するヒトゲノム配列で置換された、ヒト化ＫＬＫＢ１遺伝子座を含む。動物を計量し、個々の体重に対して特有の体積で投薬した。合計で５つの群が存在した（Ｎ＝４であり、２匹が雄、２匹が雌のマウスである）。

【０６４２】

修飾ｓｇＲＮＡ（Ｇ１２２６０、Ｇ１２２６７、Ｇ１２２９３、Ｇ１２３０３、およびＧ１２３２１）およびＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有するＬＮＰを、体重１キログラム当たり１０ｍｌの体積で総ＲＮＡカーゴに基づいて、０．３ｍｇ／ｋｇで外側尾静脈を介して投薬した。最終ＬＮＰを、実施例１に記載の分析方法に従って、カプセル化効率、多分散指数、および平均粒径を決定するために特性決定した。ＬＮＰ投与後１１日目にマウスを安楽死させ、ＤＮＡ抽出のために肝臓組織を採取した。組織を、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂａｓｈｉｎｇ　Ｂｅａｄ　Ｌｙｓｉｓ　Ｒａｃｋを使用して溶解し、製造者のプロトコルに従って、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔを使用してＤＮＡを抽出した。抽出したＤＮＡを、シークエンシングのために提出されるＰＣＲに供した。

【０６４３】

血液を血清分離管に採取し、室温で２時間凝固させた後、遠心分離した。等分した血清に対してＥＬＩＳＡを行い、９６ウェルプレート中で希釈した。

【０６４４】

治療されたマウスで観察された編集を図８Ａおよび表１６Ａに示す。

【表５２】

表１６Ａ．Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおけるインビボ編集データ

ガイド	編集%	編集 SD	N
G12260	32.9	10.96	4
G12267	72.83	1.17	4
G12293	43.05	5.59	4
G12303	14.38	5.60	4
G12321	35.53	11.11	4

【０６４５】

投与前および投与後の血清ヒトＫＬＫＢ１タンパク質レベルを、実施例１に記載されるようにＥＬＩＳＡアッセイを使用して測定した。その結果を表１６Ｂおよび図８Ｂに示す。

【表５３】

表１６Ｂ．Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおける分泌ＫＬＫＢ１タンパク質レベル

ガイド	用量 (mpk)	投薬前	SD	投薬後	SD	N
G12260	0.3	19.04	6.20	13.10	7.96	4
G12267	0.3	22.48	9.32	1.42	0.41	4
G12293	0.3	18.54	5.41	7.59	2.10	4
G12303	0.3	21.21	9.98	23.11	8.58	4
G12321	0.3	18.07	5.21	11.22	4.51	4

【０６４６】

試料からの血清ヒトＫＬＫＢ１タンパク質レベルを、実施例１に記載されるようにエレクトロケミルミネッセンスベースアレイ（ＭＳＤ）を使用して測定し、ベースラインレベルと比較した。結果を表１７および図８Ｃに示す。

【表５４】

表１７．インビボでのＫＬＫＢ１タンパク質レベル

ガイド	用量 (mpk)	投薬前	SD	投薬後	SD	血清 KD%	N
G12260	0.3	10.44	0.43	6.84	0.09	38	4
G12267	0.3	10.59	0.37	BLOD*	-	97**	2
G12293	0.3	10.74	0.24	3.92	0.04	64	4
G12303	0.3	13.86	0.34	7.78	0.35	35**	4
G12321	0.3	8.38	0.1	3.92	0.16	55	4

＊検出限界を下回っている、＊＊近似値

【０６４７】

各配列についてのＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡレベルを、実施例１に記載され、表１８および図８Ｄに示すように定量的ＰＣＲによって測定した。タンパク質の低下は、実施例１に記載されるようにウエスタンブロット分析によって確認した。

【表５５】

表１８．ｑＰＣＲ結果

ガイド	倍率変化	SD	N
G12260	1.20	0.35	4
G12267	0.51	0.41	4
G12293	0.73	0.22	4
G12303	1.10	0.23	4
G12321	1.18	0.41	4
TSS	1.01	0.17	2

【０６４８】

実施例７．Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおけるヒトＫＬＫＢ１ガイドのインビボ編集活性

この試験において、実施例６に記載のヒト化ＫＬＫＢ１マウスを使用し、同じプロトコルを使用して調製した。合計で５つの群が存在した（Ｎ＝５であり、２匹が雄、３匹が雌のマウス、またはその逆）。修飾ｓｇＲＮＡおよびＣａｓ９タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有するＬＮＰを、０．３ｍｇ／ｋｇで外側尾静脈を介して投与し、実施例６に記載されるように特性決定した。

【０６４９】

ＬＮＰ投与後１３日目に、マウスを安楽死させた。肝臓組織および血液を、シークエンシングおよびＥＬＩＳＡ分析のために実施例６に記載されるように処理した。

【０６５０】

表１９および図９Ａ～９Ｄは、ＫＬＫＢ１編集、血清プレカリクレインタンパク質（プレカリクレインおよびカリクレインの両方を検出するＥＬＩＳＡを使用して検出される）（ｕｇ／ｍｌ）、治療マウスの対照ＴＳＳにおけるＫＬＫＢ１タンパク質レベルの率としてのプレカリクレインタンパク質のレベル、ならびにプレカリクレインタンパク質率に対する肝臓編集率の相関をそれぞれ示す。Ｇ０１２３２３およびＧ０１２２５３ガイドを試験したが、ＮＧＳ法の不具合により編集が検出されなかった。

【表５６】

表１９．Ｈｕ－ＫＬＫＢ１マウスモデルにおける特定のガイドの編集率および血清プレカリクレイン

用量(mpk)	ガイド	試料	編集%	血清プレカリクレイン(ug/ml)	血清プレカリクレイン(TSS 平均%)
0	TSS	平均	0.1	19.49	100
		動物 1	0.1	14.77	76
		動物 2	0.1	18.29	94
		動物 3	0.1	14.82	76
		動物 4	0.1	26.82	138
		動物 5	0.1	22.76	117
0.3	G012304	平均	21.9	12.4	64
		動物 1	24.7	9.53	49
		動物 2	21.0	9.88	51
		動物 3	29.3	7.94	41
		動物 4	18.8	20.32	104
		動物 5	15.9	14.34	74
	G012305	平均	26.0	10.58	54
		動物 1	20.6	9.09	47
		動物 2	32.5	8.85	45
		動物 3	27.9	8.13	42
		動物 4	22.7	14.08	72
		動物 5	26.5	12.75	65
	G012259	平均	24.2	10.88	56
		動物 1	41.0	5.83	30
		動物 2	20.3	9.96	51
		動物 3	27.6	7.42	38
		動物 4	9.4	17.83	91
		動物 5	22.8	13.36	69
	G012278	平均	24.0	10.91	56
		動物 1	29.8	7.15	37
		動物 2	35.2	6.99	36
		動物 3	28.6	6.16	32
		動物 4	18.2	17.21	88

		動物５	8.0	17.07	88
	G012280	平均	13.8	14.71	75
		動物１	21.4	10.70	55
		動物２	24.0	8.92	46
		動物３	4.8	20.46	105
		動物４	8.9	17.34	89
		動物５	9.7	16.11	83
	G012294	平均	15.9	15.4	79
		動物１	21.1	10.38	53
		動物２	15.9	9.69	50
		動物３	15.2	15.37	79
		動物４	14.9	19.13	98
		動物５	12.4	22.44	115
	G012298	平均	36.9	9.05	46
		動物１	40.8	4.99	26
		動物２	46.6	5.26	27
		動物３	44.9	5.38	28
		動物４	25.3	15.01	77
		動物５	26.9	14.61	75

【０６５１】

実施例８．Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおけるＫＬＫＢ１遺伝子編集のインビボ用量応答

この試験において、実施例６に記載のヒト化マウスを使用し、同じプロトコルを使用して調製した。合計で５つの群が存在した（Ｎ＝５であり、２匹が雄、３匹が雌のマウス、またはその逆）。Ｇ１２２６７およびＣａｓ９タンパク質をコードするｍＲＮＡを含有するＬＮＰを、体重１ｋｇ当たり０．３、０．１、０．０３および０．０１ｍｇで投薬し、実施例６に記載されるように特性決定した。

【０６５２】

ＬＮＰ投与後１３日目に、マウスを安楽死させた。肝臓組織を、ＤＮＡシークエンシングのために実施例６に記載されるように処理した。血液を、実施例６に記載のように処理し、分泌ヒトプレカリクレインを、実施例１に記載されるように、プレカリクレインおよびカリクレイン（総カリクレインとも呼ばれる）を検出するＥＬＩＳＡを介して測定した。

【０６５３】

ＲＮＡ分析のために、肝臓組織を、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｂａｓｈｉｎｇ　Ｂｅａｄ　Ｌｙｓｉｓ　Ｒａｃｋを使用して溶解し、製造者のプロトコルに従って、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、カタログ番号７４１０６）を使用してＲＮＡを抽出した。ＲＮＡを、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　８０００（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号ＮＤ－８０００－ＧＬ）を使用して定量化した。使用前に、ＲＮＡ試料を－２０℃で保存した。

【０６５４】

ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｏｎｅ－Ｓｔｅｐ　ｑＲＴ－Ｐ

ＣＲ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１１７３２－０８８）を用いてＰＣＲ反応を作製した。この反応には、Ｈｕ　ＫＬＫＢ１を標的とする定量ＰＣＲプローブおよび内部対照Ｍｓ　ＰＰＩＢを使用した。定量ＰＣＲアッセイは、製造者の仕様に従って、適切な反応体積にスケール調整し、上で指定したＨｕ　ＫＬＫＢ１およびＭｓ　ＰＰＩＢプローブを使用して行った。製造者のプロトコルに従って、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号４３７６６００）を使用して、リアルタイムＰＣＲ反応および転写物の定量化を実行した。

【０６５５】

ビヒクル対照群由来のプールされたｍＲＮＡ２０ｎｇ／ｕＬで開始し、５つのさらなる３倍希釈を０．０６ｎｇ／ｕＬで終了する標準曲線を用いて、Ｈｕ　ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡを定量化した。Ｃｔ値をＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍから決定した。ＫＬＫＢ１試薬で治療された細胞についての総分泌ヒトプレカリクレインタンパク質の低下を、実施例１に記載されるようにＥＬＩＳＡによって決定した。

【０６５６】

表２０および図１０は、編集率、ＴＳＳビヒクル対照治療マウスに対する率としての血清プレカリクレインレベル、およびＴＳＳビヒクル対照治療マウスに対する率としてのｍＲＮＡ転写産物レベルを示す。

【表５７】

表２０　Ｈｕ　ＫＬＫＢ１マウスモデルにおける編集率、ＫＬＫＢ１　ｍＲＮＡ（基底レベルに対する％）および血清プレカリクレインタンパク質レベル（基底レベルに対する％）

ガイド	用量(mpk)		編集%	%TSS タンパク質	%TSS mRNA	SD
TSS	0	平均	0.1	100	100.5	9.7
		動物１	0.1	75.8		
		動物２	0.1	93.8		
		動物３	0.1	76.0		
		動物４	0.1	137.6		
		動物５	0.1	116.8		
G12267	0.01	平均	3.9	91.9	100.1	9.5
		動物１	4.4	55.3		
		動物２	3.8	57.3		
		動物３	4.5	126.2		
		動物４	4.2	122.2		
		動物５	2.6	98.6		
	0.03	平均	19.0	64.2	69.3	13.8
		動物１	22.1	38.6		
		動物２	0.3	51.0		
		動物３	26.9	78.9		
		動物４	21.3	80.5		
		動物５	24.3	72.2		
	0.1	平均	55.4	23.3	48	11.4
		動物１	52.1	17.6		
		動物２	52.7	19.6		
		動物３	56.5	25.3		
		動物４	57.5	25.6		
		動物５	58.0	28.3		
	0.3	平均	72.9	3.1	23	13
		動物１	73.9	2.7		
		動物２	70.4	2.9		
		動物３	72.7	3.1		
		動物４	73.1	3.4		
		動物５	74.3	3.4		

【０６５７】

実施例９．血管漏出試験

ヒト化マウスにおけるＫＬＫＢ１遺伝子編集、総カリクレインタンパク質発現、および血管漏出を評価するために試験を行った。この試験では、実施例１に記載されるヒト化マウスを使用した。６つの群が存在した（Ｎ＝５であり、１群当たり２匹が雄、３匹が雌のマウス）。動物を計量し、個々の体重に対して特有の体積で投薬した。

【０６５８】

ｓｇＲＮＡ（Ｇ１２２６７）を標的とする修飾ＫＬＫＢ１およびＣａｓ９　ｍＲＮＡを含有するＬＮＰを、体重１キログラム当たり１０ｍｌの体積で総ＲＮＡカーゴに基づいて

、０．０３ｍｇ／ｋｇ、０．１ｍｇ／ｋｇ、または０．３ｍｇ／ｋｇで、またはビヒクル対照（ＴＳＳ）で、外側尾静脈を介して投薬した。

【０６５９】

血管漏出試験の１日前に、血液を、実施例６に記載のように採取し、処理し、分泌ヒトプレカリクレインを、実施例１に記載されるように、プレカリクレインおよびカリクレイン（総カリクレインとも呼ばれる）を検出するＥＬＩＳＡを介して測定した。

【０６６０】

血管漏出アッセイを、実施例１に記載されるように行った。剖検時に、肝臓組織を収集し、実施例６に記載されるようにＤＮＡを抽出して、ＫＬＫＢ１編集を測定した。血管漏出モデルにおける色素の定量化のために、結腸組織を収集し、実施例１に記載されるように処理した。

【０６６１】

編集率、血清ｈｕ　ＫＬＫＢ１タンパク質レベル、および血管漏出の結果を表２１および図１１Ａ～１１Ｂに示す。

【表５８】

表２１．ｈｕＫＬＫＢ１マウスにおける編集率、ＫＬＫＢ１タンパク質レベル、および血管漏出

	用量 (mg/kg)	編集%	血清プレカリクレイン(ug/ml)	結腸 (OD)
TSS-1	0	0.02	100.00	0.07
TSS-2	0	0.06	94.92	0.22
対照	0.3	0.1	92.99	0.30
G012267	0.03	16.48	82.97	0.26
G012267	0.1	40.46	48.97	0.20
G012267	0.3	68.66	13.88	0.09

【０６６２】

９ヶ月にわたる耐久性について、編集率、血清プレカリクレインレベル、および血管漏出を評価するために、同様の方法を使用して別個の試験を行った。マウスに、ｓｇＲＮＡ（Ｇ１２２６７）を標的とする修飾ＫＬＫＢ１を投薬し、Ｃａｓ９　ｍＲＮＡまたは非標的ｓｇＲＮＡを、体重１キログラム当たり１０ｍｌの体積で、総ＲＮＡカーゴに基づいて、０．１ｍｇ／ｋｇまたは０．３ｍｇ／ｋｇで外側尾静脈を介して投薬した。用量応答の耐久性は、編集の増加、タンパク質レベルの減少、および血管漏出レベルの減少が、試験の長さの間、維持されたという点で観察された。

【０６６３】

実施例１０．非ヒト霊長類（ＮＨＰ）におけるＫＬＫＢ１遺伝子編集のインビボ試験

この実施例では、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）をＣａｓ９タンパク質のためのｍＲＮＡおよびＫＬＫＢ１遺伝子に対する様々なガイドとともに投与した後のカニクイザルにおけるＫＬＫＢ１遺伝子編集および総カリクレインタンパク質発現、ならびに総カリクレイン活性レベルを評価するための試験を実施した。カニクイザルをｎ＝３のコホートで治療した。本試験を、実施例１に従って、ＬＮＰ製剤を用いて実施した。各ＬＮＰ製剤は、ｍＲＮＡ：ｇＲＮＡ重量比が２：１のポリアデニル化Ｃａｓ９　ｍＲＮＡ（配列番号５１６を含む）およびｇＲＮＡ（Ｇ０１３９０１、カニクイザル特異的ＫＬＫＢ１ガイドＲＮＡ）を含有していた。動物に、総ＲＮＡカーゴに基づいて、１ｋｇ当たり１．５、３、または６ｍｇの用量で投薬した。インデル形成（編集率）をＮＧＳにより測定した。総カリクレイン活性および血清カリクレインタンパク質レベルを実施例１に記載

されるように測定した。

【０６６４】

この試験は、ブラジキニンの放出を引き起こす生物学的経路の一部であるＫＬＫＢ１がＧ０１３９０１によってノックアウトされると、ＨＡＥ発作率に対して治療的に意味のある影響を達成することが示された標的活性を超える堅牢な応答である、ＮＨＰ群におけるカリクレイン活性の最大９０％の低下、またはそれより大きな低下をもたらしたことを示した（６０％のカリクレイン活性の低下、Ｂａｎｅｒｊｉ，２０１７）。この試験は、編集率の増加、血漿カリクレインレベルの低下、およびカリクレイン活性の低下の間の用量依存的な相関関係を示した。この応答は、ＮＨＰでは、１年にわたって持続した。循環カリクレインタンパク質および活性レベルは、表２２および２３、ならびに図１２Ａ～１２Ｂに提供される。

【表５９】

表２２．カリクレイン活性（基底活性に対する%）

	TSS(n=3)		1.5mpk(n=3)		3mpk(n=3)		6mpk(n=3)	
日数	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
0	100	0	100	0	100	0	100	0
7	108.4	9	67.8	7	42.8	12.4	18.2	10.6
14	101.8	18.3	31.1	3.2	15.9	11	5.3	1.6
28	124.4	7.9	26.8	6.5	10.6	5.4	3.9	1.4
42	117.8	5.8	19.8	11.9	8.6	4.4	3.6	0.4
56	130.3	32.5	8.8	5	3.4	0.6	4.2	2.2
70	109.2	15	6	1.7	3	0.4	3.9	1.6
84	121.3	25.7	10.6	3.8	4.2	2.1	4.7	2.5
105	130.8	15.5	23.3	4.9	6	3.6	4.7	2.5
119	88.2	9.1	12.2	10.2	3.4	0.5	3	0.5
147	101.1	3.3	11.9	6.6	4.5	1.4	3	0.5
161	113.2	13.4	21	1.8	6	2.8	5.6	1.8
180	122.3	8.7	19.2	9.5	4.7	1	5	1.9
238	125.5	27.3	16.6	6.5	4.7	1.4	3.2	0.7
252	122.7	27	19.1	7.3	8.2	4.4	3.1	0.7
266	115	23.3	13.9	3.3	8.9	5.2	2.7	0.6
280	112.2	22.7	17.5	2.3	6.8	3.6	3	1
294	126.3	34.1	17	5.8	7.9	4.1	2.9	0.6
308	122.9	28.9	18.2	2.3	7.4	3.3	3	0.8
326	111.6	23	13.3	5.2	5.5	2.9	3.5	0.4
333	127.3	22.4	15.9	1.8	6.8	2.8	3.3	0.4
347	108.4	11.7	16.9	1	4.1	1.8	2.9	0.3
365	118	2.2	24.1	10.2	10	5.7	3.4	0.7

【表６０】

表２３．血漿カリクレインタンパク質レベル（基底レベルに対する%）

	TSS(n=3)		1.5mpk(n=3)		3mpk(n=3)		6mpk(n=3)	
日数	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
0	100	0	100	0	100	0	100	0
14	101.3	14.9	28.8	7.4	27.1	8.2	13.7	3.3
28	117.7	7	32.7	8.5	16.9	6.8	6.6	2.3
42	112.6	23.5	31.5	9.1	16	7	6.3	2.8
56	111	16	30.1	8.8	15.4	6	5.8	2.5
70	112.5	14.1	29.8	8	15.4	5.8	5.8	2.8
84	133.6	9	38.7	11.1	17.1	6.7	6.7	2.5
105	118.2	20.1	47	12.7	22.3	10.3	7.6	3.8
119	96	9.8	31.6	8.7	18.1	7.2	6.4	2.2
147	110.7	12	32.1	8.3	18.3	8.1	6.7	2.2
161	119.3	6.1	35.8	10.5	7.5	6.8	7.4	3.5
180	131	10.1	33.8	11.4	18	10.1	2.9	1
238	106.2	3.7	27.4	10.8	16.4	9.8	3.7	0.9
252	114.3	21.4	27.9	9.1	15.6	7.1	3.9	0.8
266	117.6	8.7	28.7	9.7	21.8	10.4	3.7	0.5
280	93.4	22.1	33.7	7.1	24.6	9.8	6.3	2.9
294	122.1	23.7	30.4	13.8	24.6	14	7.4	4
308	93.2	12.8	20.6	13.8	27.6	14.2	6.2	3.1
326	なし		29.7	7.3	23.8	12.5	8	2.8
333	130.2	25.5	30.9	6.4	25.3	12.4	7.8	2.3
347	106.9	15	26	8.2	22.1	11.2	7.3	3.2
365	108.5	41.3	22.7	8	11.4	5.3	4.3	1.6

【０６６５】

選択ＮＨＰ血清試料の試験は、ＴＳＳ緩衝液対照群と治療群とを比較したときに、１０週目または１５週目に（プロトロンビン、ＡＰＴＴ、およびフィブリノーゲン（全て１０週目に）およびＸＩＩ因子（１５週目に）の測定に基づく）ＮＨＰにおけるＫＬＫＢ１ノックアウトを伴う凝固経路バイオマーカーへの影響が観察されなかったことを見出した。

【０６６６】

ＮＨＰ試験を繰り返して、ヒトＫＬＫＢ１に完全に相補的なガイド配列を含むガイドＧ０１２２６７を使用して、カニクイザルにおけるＫＬＫＢ１総カリクレインタンパク質発現、および総カリクレイン活性レベルを評価した。Ｇ０１２２６７のガイド配列は、カニクイザルＫＬＫＢ１に完全に相補的なガイド配列を有するＧ０１３９０１と比較した場合、１個のヌクレオチド差を有する。この試験における実験プロトコルおよびＬＮＰ製剤は、動物（ｎ＝３）が総ＲＮＡカーゴに基づいて１ｋｇ当たり３ｍｇのみ投与されたことを除いて、上の実験に記載されたものと本質的に同じであった。総カリクレイン活性および血清カリクレインタンパク質レベルを、実施例１に記載される方法を使用して測定した。

【０６６７】

この試験では、Ｇ０１２２６７を用いたＫＬＫＢ１のノックダウンにより、ＮＨＰ群に

おけるカリクレイン活性が最大６５％低下したことが示された。この応答は、ＮＨＰでは、９ヶ月まで持続した。循環カリクレインタンパク質および活性レベルは、表２４および２５、ならびに図１３Ａ～１３Ｂに提供される。

【表６１】

表２４．カリクレイン活性（基底活性に対する％）

	TSS(n=3)		3mpk(n=3)	
日数	平均	標準偏差	平均	標準偏差
0	100	なし	100	なし
7	90.9	13.7	68.7	11.3
15	87.7	6.6	51.3	18.7
28	90.5	2.5	39.3	24
42	96.5	4.8	31.9	19.5
56	94.5	1.6	34.1	16.7
70	96.2	7.2	42.3	25.7
91	100.2	11.7	45.3	27.6
106	100.2	6.3	45.7	14.3
120	99.8	7.4	46.5	11.1
134	115.2	8.5	47.5	32.4
148	91.5	2	52.9	34.7
162	86.1	21.1	50.1	43.2
180	97.9	1.8	47.3	22.1
192	87.9	1.9	43	24.6
208	94.4	5.8	48	23
222	97	2.9	34.6	21.1
236	97.2	2.2	43.5	19.1
250	91.8	12	46.5	18.3
264	99.9	10.6	51.3	25.2
278	105.3	13.4	60.8	32.3

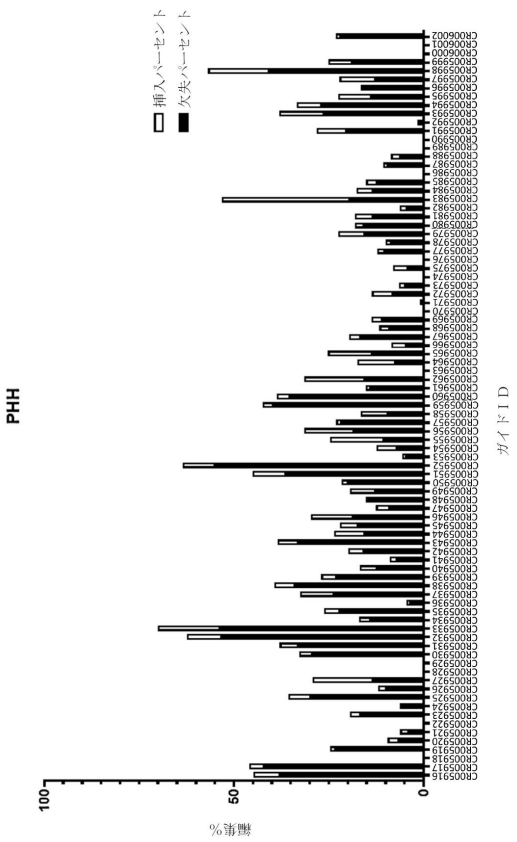
【表６２】

表２５．血漿カリクレインタンパク質レベル（基底レベルに対する％）

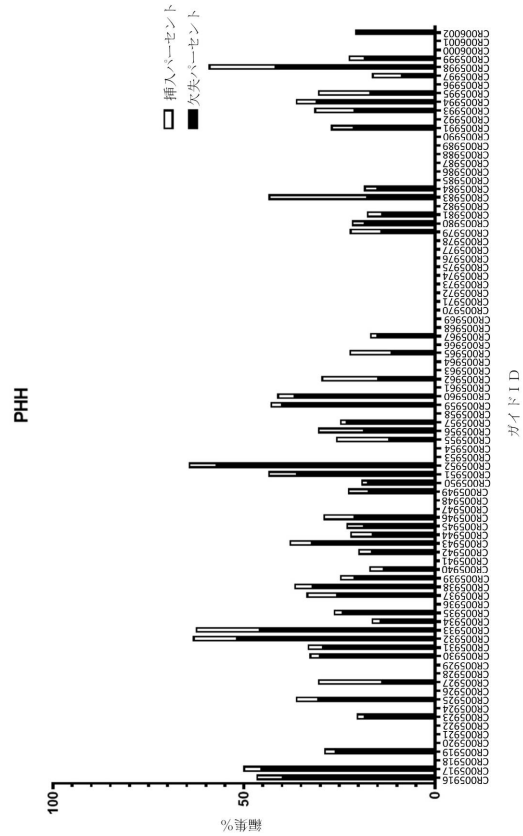
	TSS(n=3)		3mpk(n=3)	
日数	平均	標準偏差	平均	標準偏差
0	100	なし	100	なし
7	99.6	5.1	72.3	13.3
15	89.7	13.1	50.6	9
28	93.9	5.2	52.8	22.3
42	90.3	8.6	52.7	25.5
56	104.2	17.3	49.9	19.1
70	93.9	5.2	52.8	22.3
91	90.3	8.6	52.7	25.5
106	99.3	21.9	43.1	17.3
120	121.7	12.6	41.1	6.2
134	104.2	12	49.7	5.5
148	93	15.8	47.5	11.8
162	100.3	15.7	56.2	26.7
180	106.8	10.9	44.1	33.2
192	96.5	20.5	52	26.6
208	105.6	25	52.9	28.5
250	103.7	21.5	63.3	17.4
264	101.4	7	67.3	15.4
278	94.3	14.4	62.6	16.7

【図面】

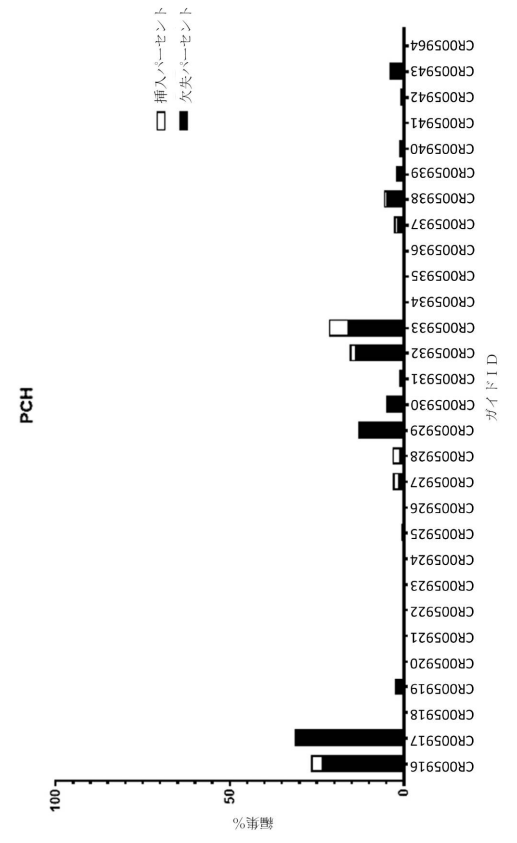
【図１Ａ】



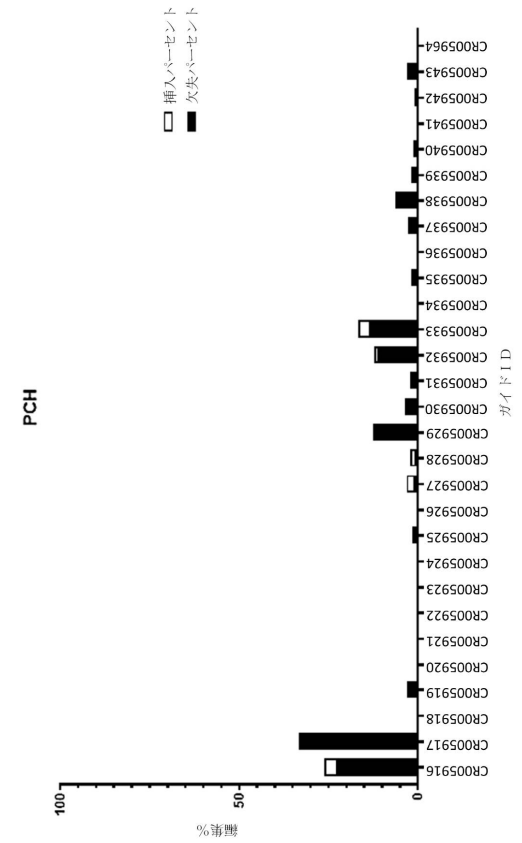
【図１Ｂ】



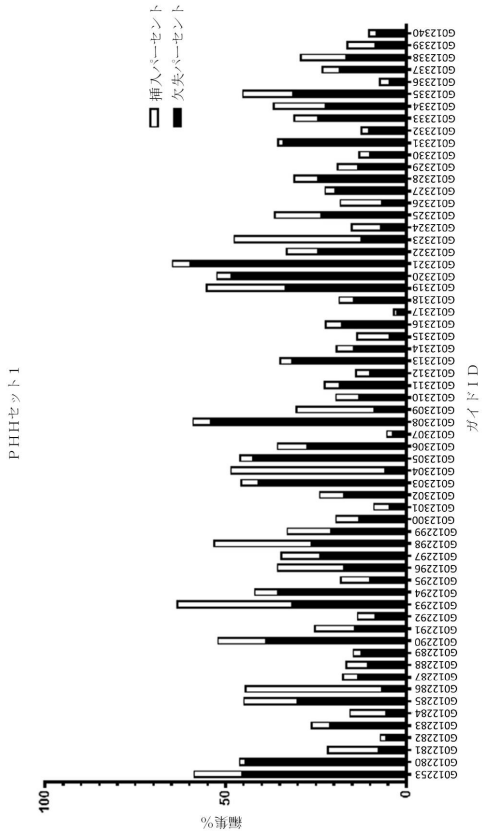
【図１Ｃ】



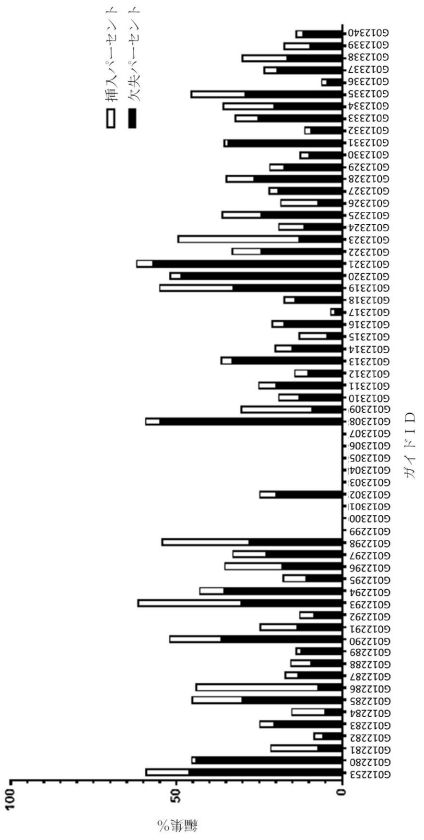
【図１Ｄ】



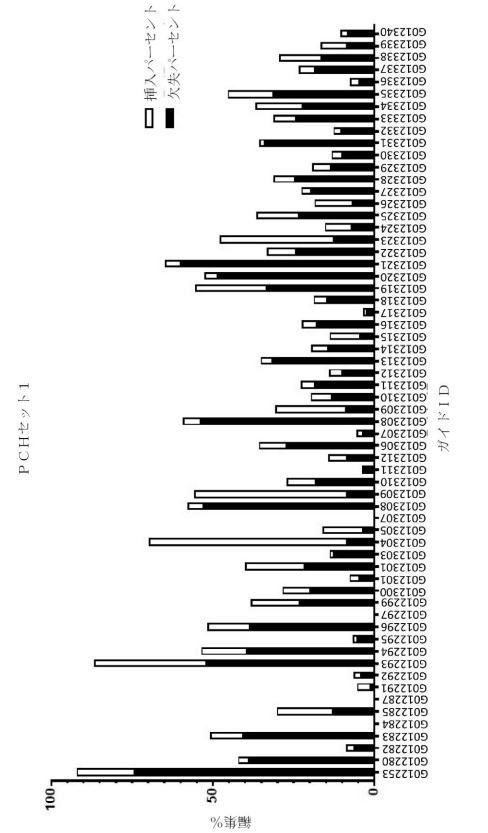
【図２Ａ】



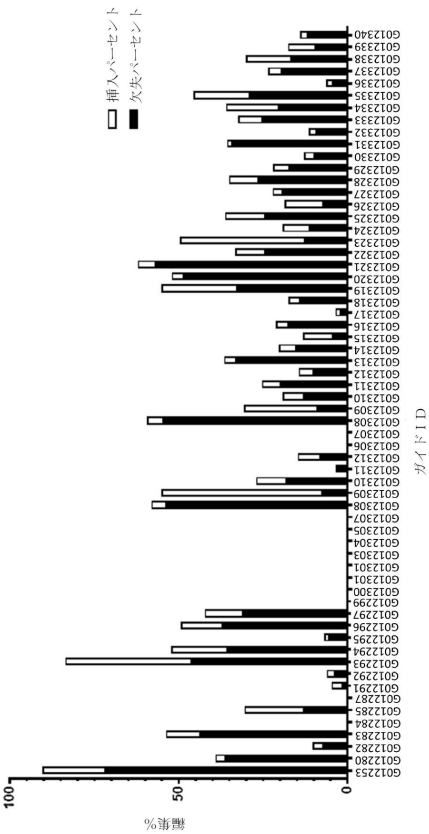
【図２Ｂ】



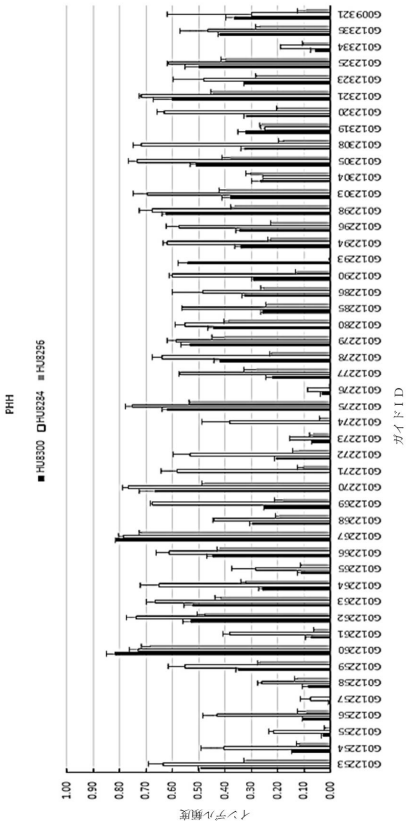
【図２Ｃ】



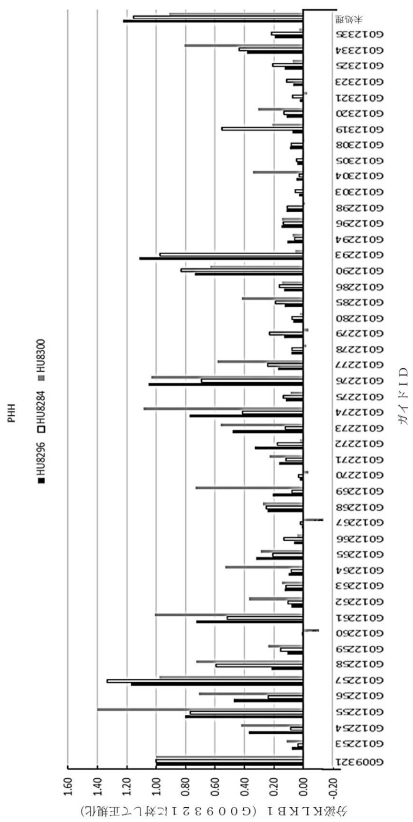
【図２Ｄ】



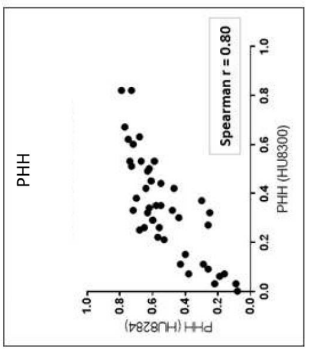
【図３Ａ】



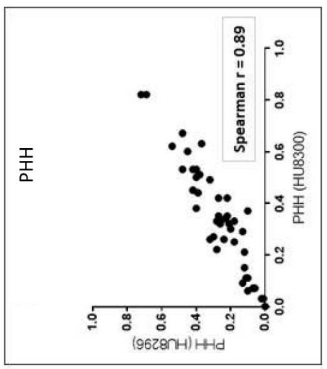
【図３Ｂ】



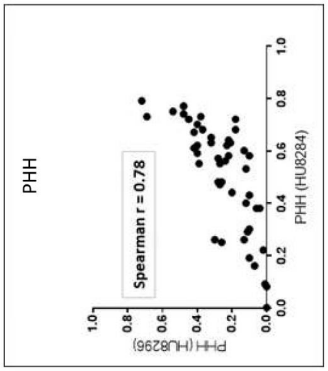
【図３Ｃ】



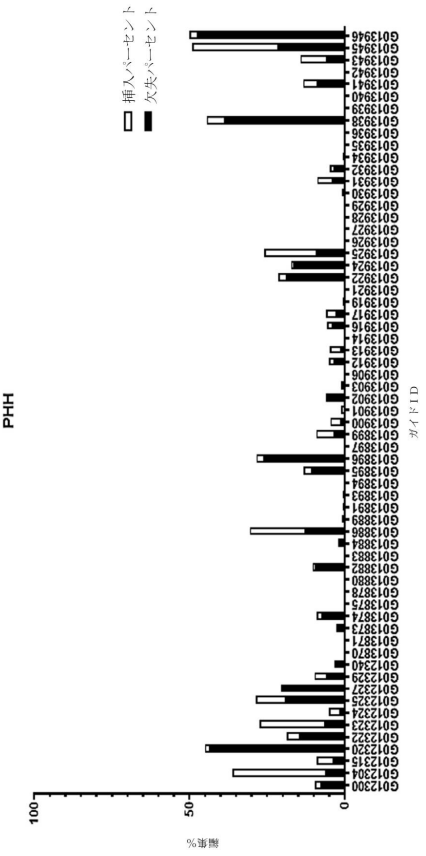
【図３Ｄ】



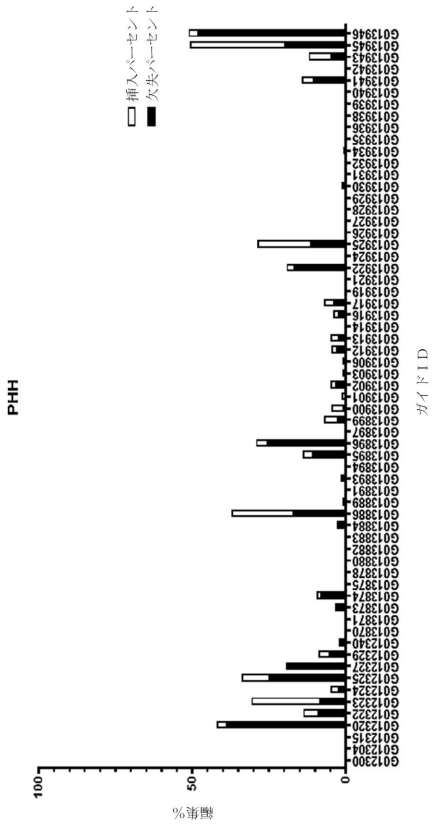
【図３Ｅ】



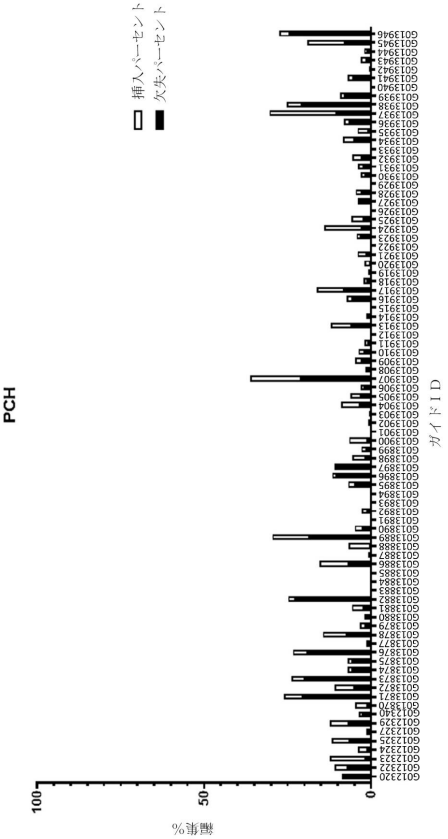
【図４Ａ】



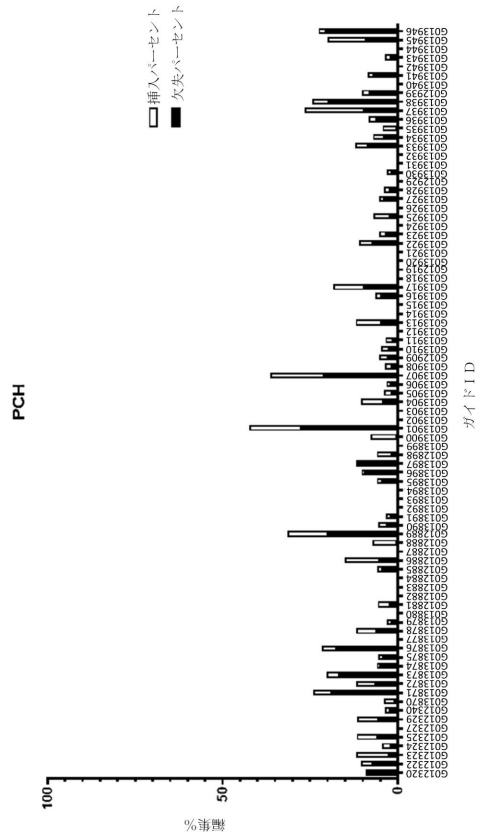
【図４Ｂ】



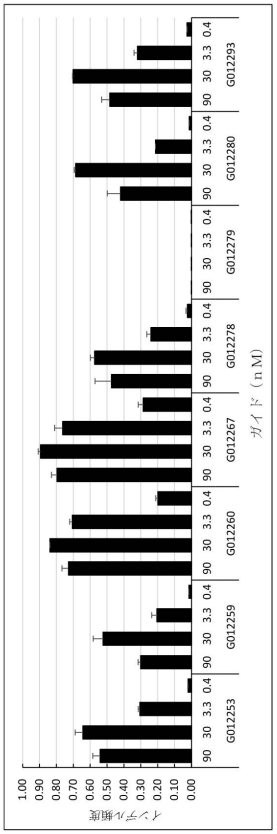
【図４Ｃ】



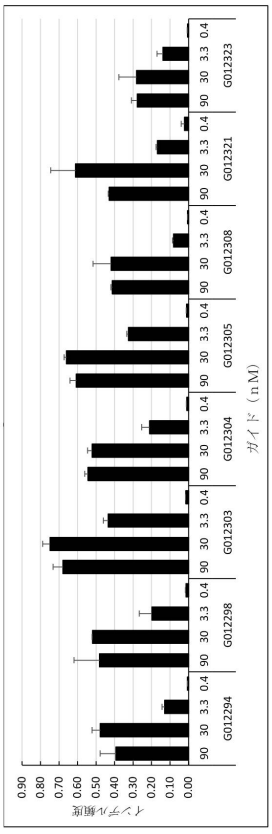
【図４Ｄ】



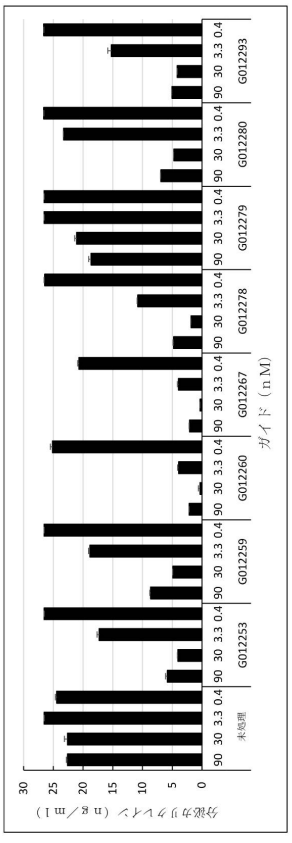
【図５Ａ】



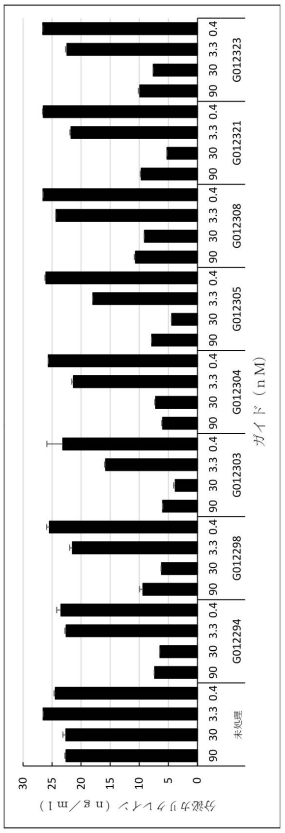
【図５Ｂ】



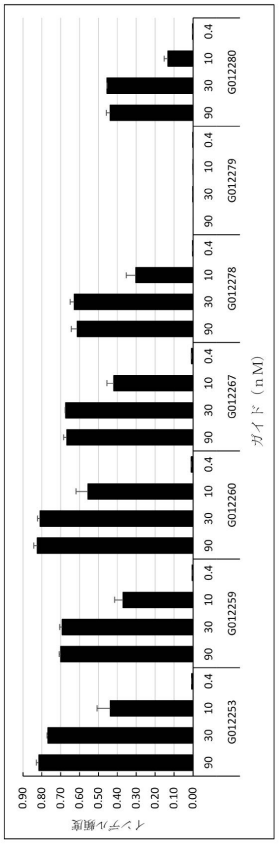
【図５Ｃ】



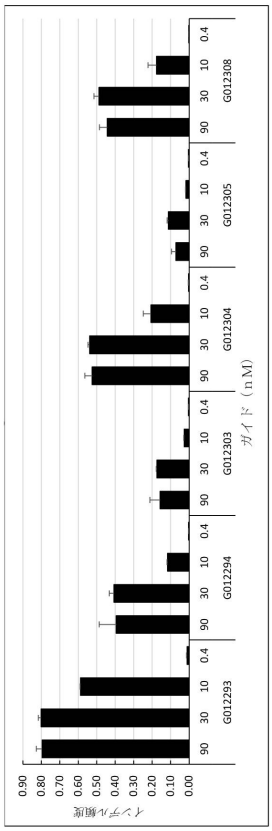
【図５Ｄ】



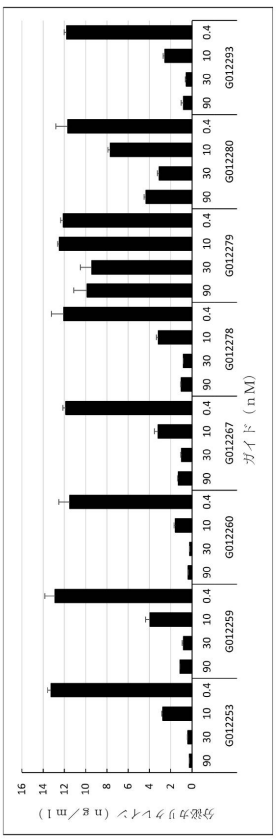
【図５Ｅ】



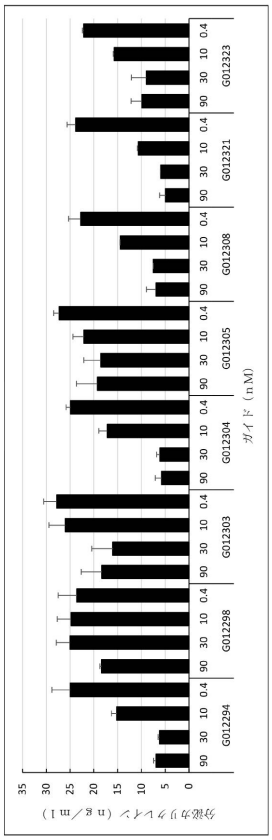
【図５Ｆ】



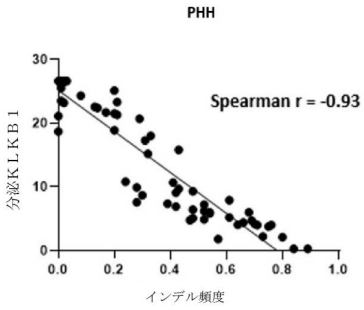
【図５Ｇ】



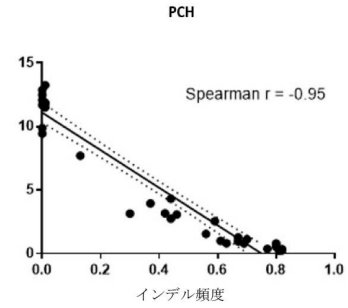
【図５Ｈ】



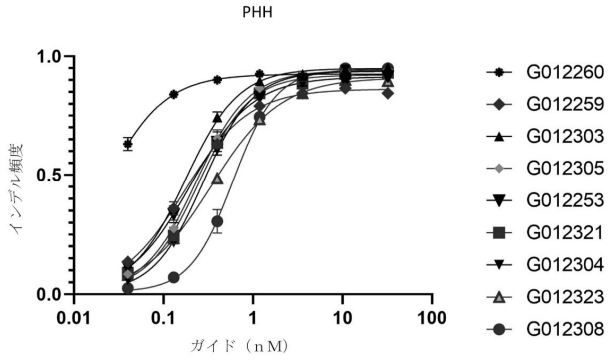
【図５Ｉ】



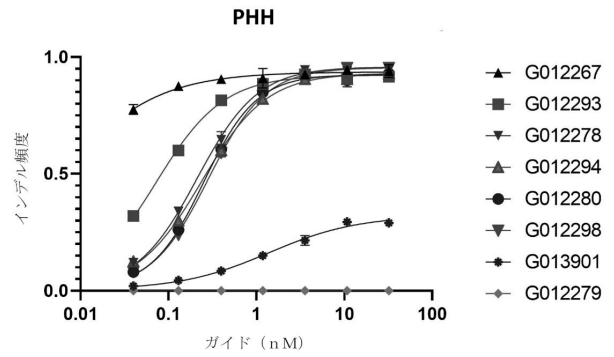
【図５Ｊ】



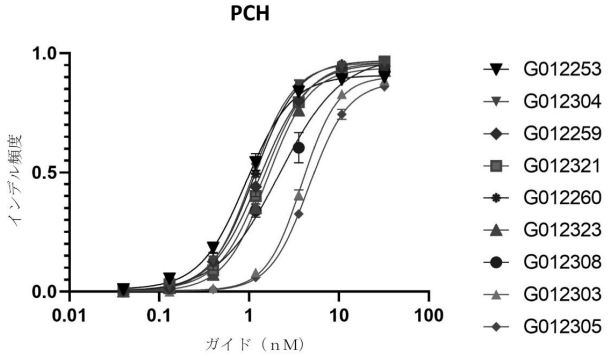
【図６Ａ】



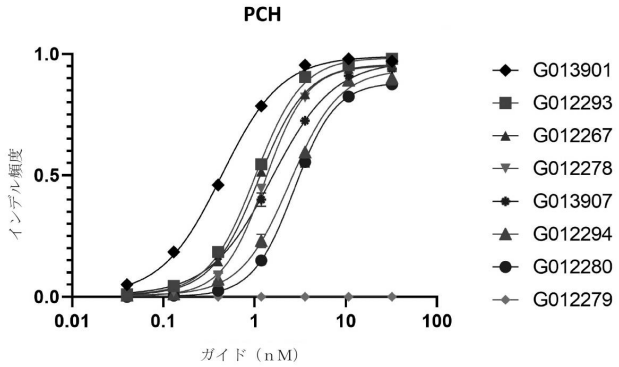
【図６Ｂ】



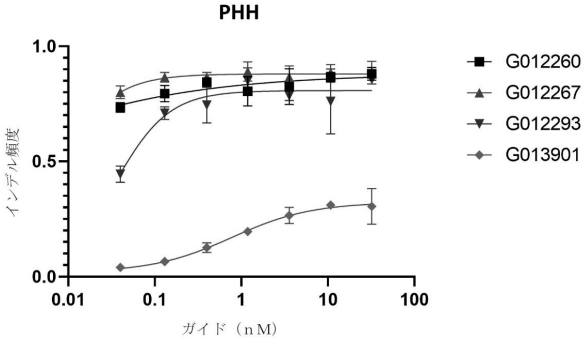
【図６Ｃ】



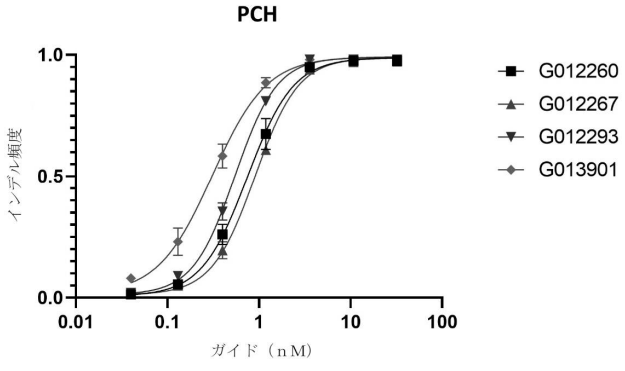
【図６Ｄ】



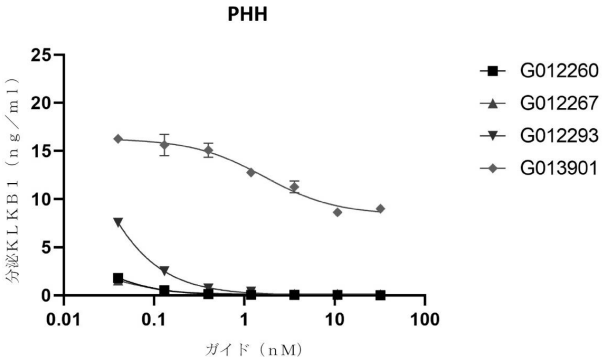
【図７Ａ】



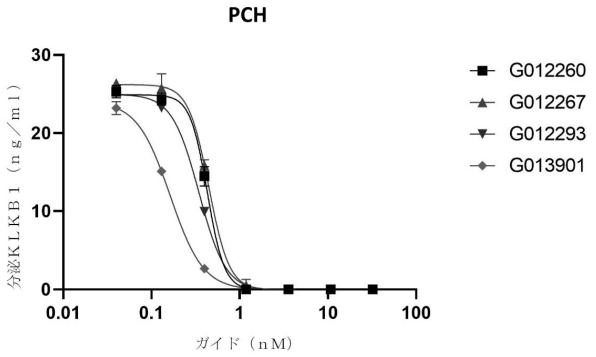
【図７Ｂ】



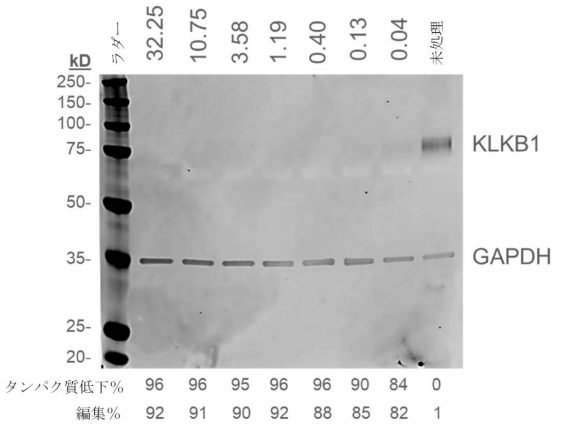
【図７Ｃ】



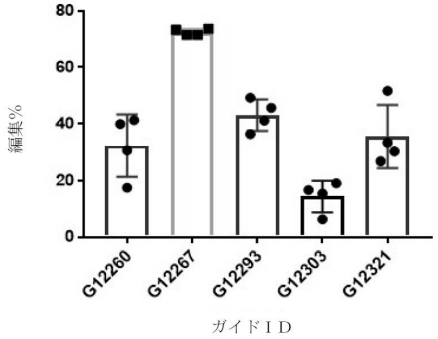
【図７Ｄ】



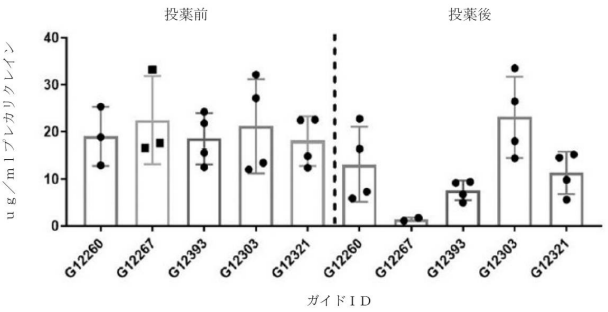
【図７Ｅ】



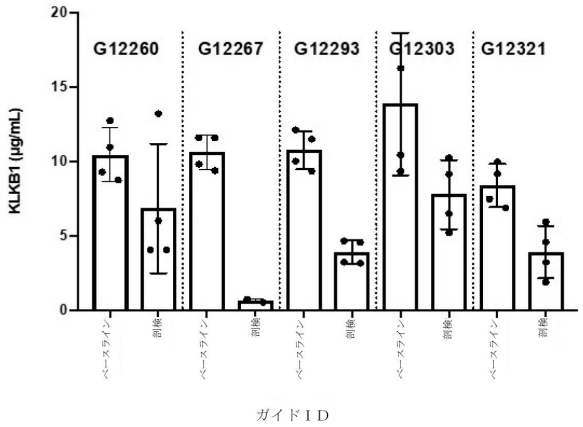
【図８Ａ】



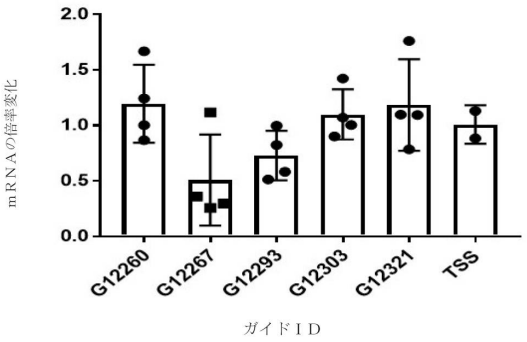
【図８Ｂ】



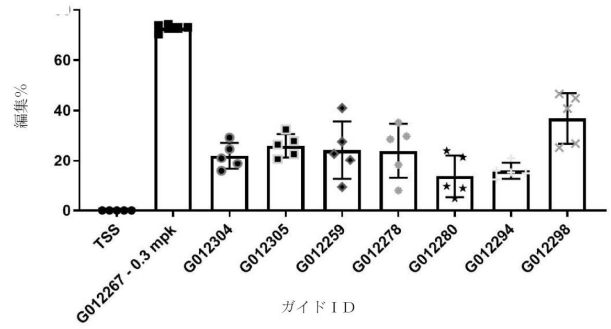
【図８Ｃ】



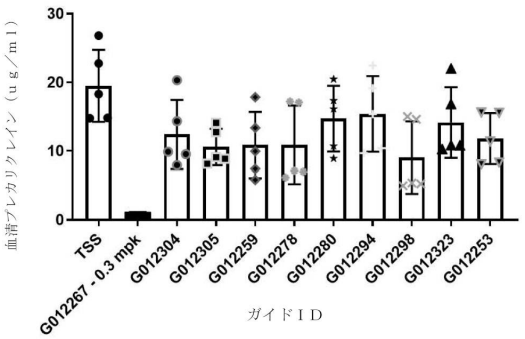
【図８Ｄ】



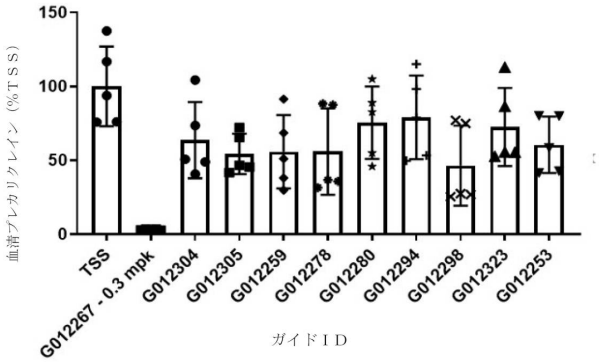
【図９Ａ】



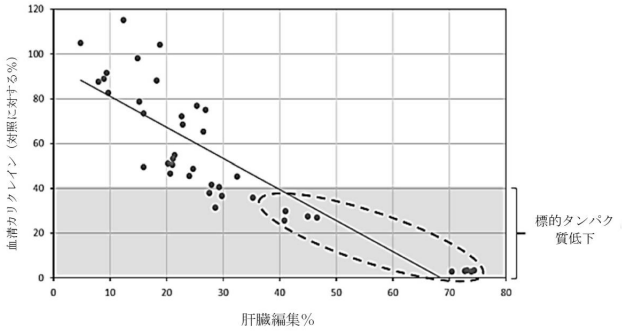
【図９Ｂ】



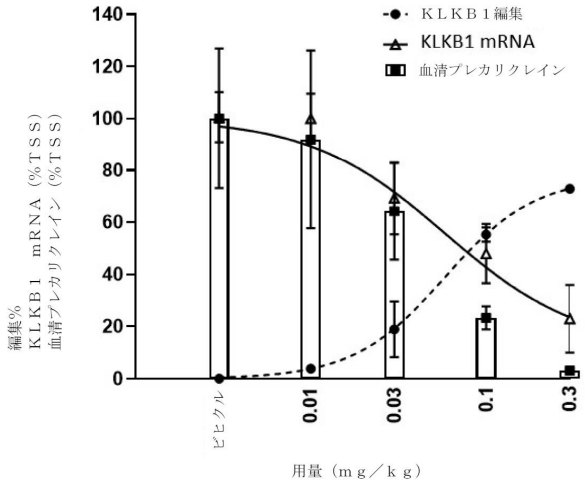
【図９Ｃ】



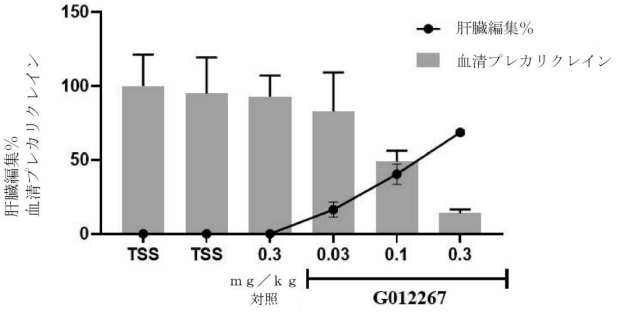
【図９Ｄ】



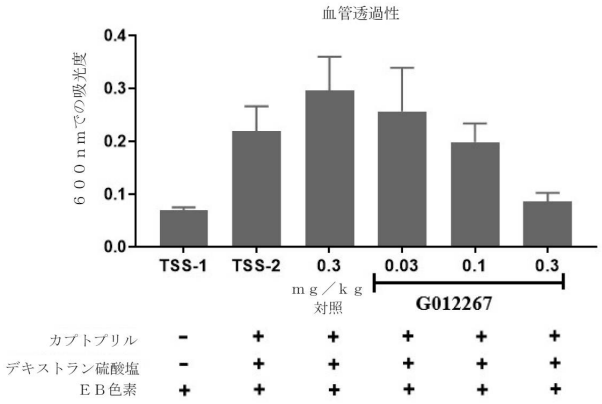
【図１０】



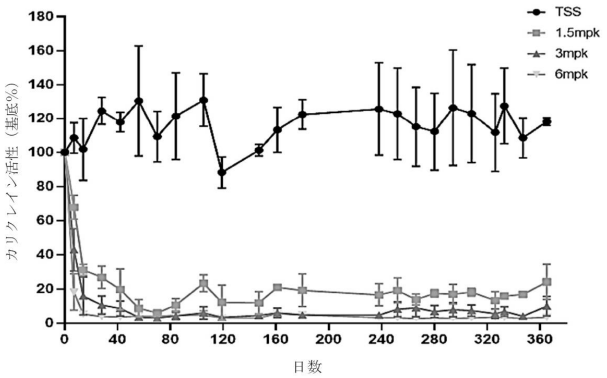
【図１１Ａ】



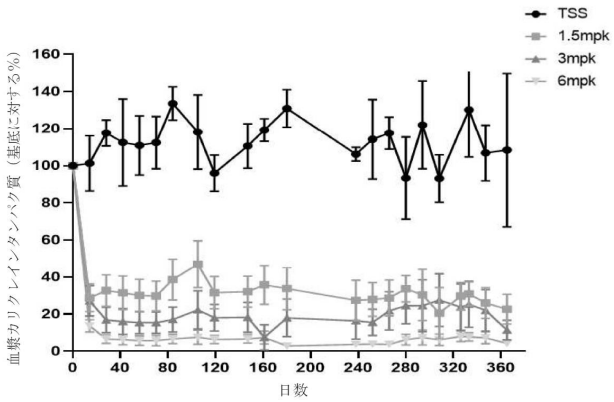
【図１１Ｂ】



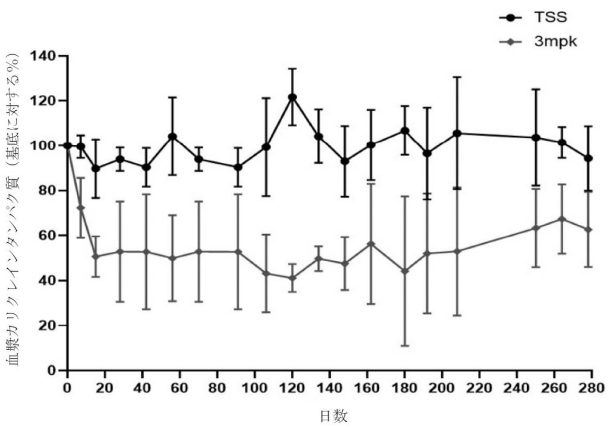
【図１２Ａ】



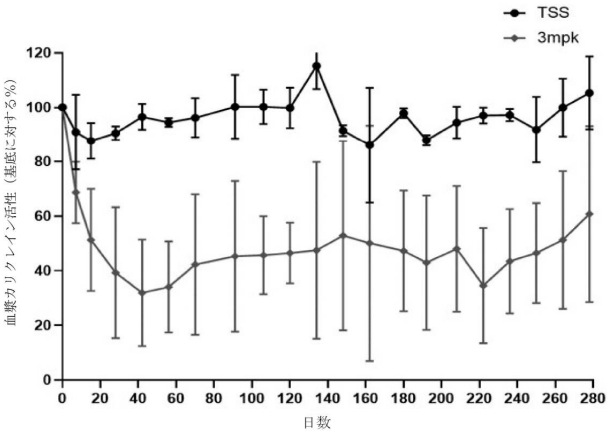
【図１２Ｂ】



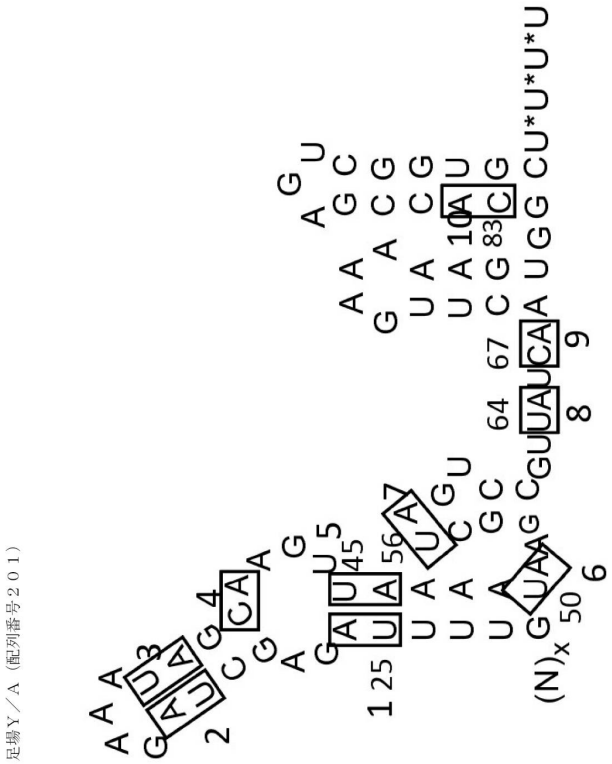
【図１３Ａ】



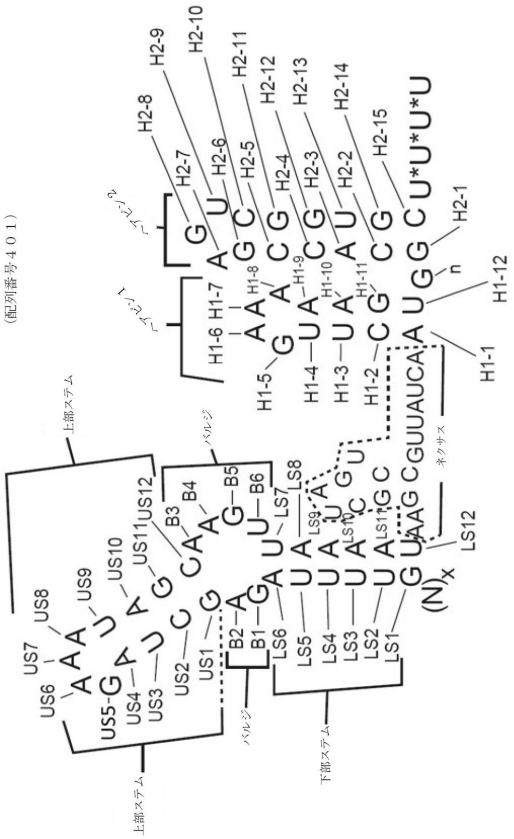
【図１３Ｂ】



【図１４】



【図１５】



【配列表】

2023512758000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/016730

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/016730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 A61K31/712 A61K31/7125
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/031679 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 5 March 2015 (2015-03-05) sequences 597,583,584	1-50
A	WO 2015/168532 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]) 5 November 2015 (2015-11-05) sequences 597,558,583,584	1-50
A	WO 2019/010342 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 10 January 2019 (2019-01-10) sequence 115	1-50
A	WO 2016/179342 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) sequence 289	1-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 May 2021	25/05/2021

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/016730

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015031679 A2	05-03-2015	AU 2014312196 A1	03-03-2016
		AU 2019204977 A1	01-08-2019
		BR 112016004093 A2	17-10-2017
		CA 2921839 A1	05-03-2015
		CN 105517556 A	20-04-2016
		EP 3038627 A2	06-07-2016
		EP 3715457 A2	30-09-2020
		ES 2790574 T3	28-10-2020
		HK 1225639 A1	15-09-2017
		JP 6652922 B2	26-02-2020
		JP 2016533751 A	04-11-2016
		JP 2020072732 A	14-05-2020
		KR 20160048119 A	03-05-2016
		RU 2016110848 A	27-11-2018
		US 2017002359 A1	05-01-2017
		US 2017314026 A1	02-11-2017
		US 2019233827 A1	01-08-2019
		WO 2015031679 A2	05-03-2015
WO 2015168532 A2	05-11-2015	AU 2015252917 A1	29-09-2016
		AU 2019284028 A1	23-01-2020
		BR 112016022855 A2	17-10-2017
		CA 2943705 A1	05-11-2015
		CN 106232125 A	14-12-2016
		DK 3137091 T3	25-01-2021
		EP 3137091 A2	08-03-2017
		IL 247862 A	31-03-2020
		JP 6665111 B2	13-03-2020
		JP 2017518045 A	06-07-2017
		JP 2020096629 A	25-06-2020
		KR 20160147891 A	23-12-2016
		US 2017183661 A1	29-06-2017
		US 2020056185 A1	20-02-2020
		WO 2015168532 A2	05-11-2015
WO 2019010342 A1	10-01-2019	EP 3649243 A1	13-05-2020
		US 2020208150 A1	02-07-2020
		WO 2019010342 A1	10-01-2019
WO 2016179342 A2	10-11-2016	AU 2016257996 A1	26-10-2017
		BR 112017021967 A2	31-07-2018
		CA 2984636 A1	10-11-2016
		CN 108271386 A	10-07-2018
		EA 201792444 A1	29-06-2018
		EP 3292201 A2	14-03-2018
		HK 1249920 A1	16-11-2018
		JP 6695902 B2	20-05-2020
		JP 2018519797 A	26-07-2018
		JP 2020188756 A	26-11-2020
		KR 20180002688 A	08-01-2018
		TW 201704472 A	01-02-2017
		US 2018100150 A1	12-04-2018
		US 2020131513 A1	30-04-2020
		UY 36671 A	30-12-2016
		WO 2016179342 A2	10-11-2016

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/18*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/18	
Ａ６１Ｋ	*47/28*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/28	
Ａ６１Ｋ	*47/24*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/24	
Ａ６１Ｋ	*47/14*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/14	
Ｃ１２Ｎ	*15/55*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55	

(32)優先日　令和2年5月1日(2020.5.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,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．ＴＷＥＥＮ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０，インテリア セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　セイツァー，ジェシカ リン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９，ケンブリッジ，エリー ストリート ４０，インテリア セラピューティクス，インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4C076　CC21 DD49 DD63 DD70 EE23
4C084　AA13 NA05 NA14 ZC211 ZC212
4C086　AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 NA05 NA14 ZC01 ZC21