

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7578590号
(P7578590)

(45)発行日 令和6年11月6日(2024.11.6)

(24)登録日 令和6年10月28日(2024.10.28)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/87 (2006.01)	C 1 2 N	15/87 Z Z N A
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11 Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09 1 1 0
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86 Z
		請求項の数 41 (全154頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-521112(P2021-521112)	(73)特許権者	520107630
(86)(22)出願日	令和1年10月18日(2019.10.18)		インテリア セラピューティクス, イン
(65)公表番号	特表2022-512731(P2022-512731 A)		コーポレーテッド
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー
(86)国際出願番号	PCT/US2019/057090		セッツ州, ケンブリッジ, エリー スト
(87)国際公開番号	WO2020/082046	(73)特許権者	リート 4 0
(87)国際公開日	令和2年4月23日(2020.4.23)		597160510
審査請求日	令和4年10月18日(2022.10.18)		リジェネロン・ファーマシューティカル
(31)優先権主張番号	62/747,509		ズ・インコーポレイテッド
(32)優先日	平成30年10月18日(2018.10.18)		REGENERON PHARMACE
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		UTICALS, INC.
(31)優先権主張番号	62/829,621		アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニ
(32)優先日	平成31年4月4日(2019.4.4)	(74)代理人	110002572
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 第 I X 因子を発現するための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

- a) 第 I X 因子の第 1 のコード配列を含む第 1 のセグメント、及び
b) 第 I X 因子の第 2 のコード配列の逆相補体を含む第 2 のセグメント
を含み、

(i) 相同性アーム、(i i) 第 I X 因子の第 1 のコード配列の発現を促進するプロモーター、または(i i i) 第 I X 因子の第 2 のコード配列の発現を促進するプロモーターのいずれかを含まない、
双方向性核酸構築物。

【請求項 2】

第 2 のコード配列が、第 1 のコード配列とは異なるコドン使用頻度を採用する、請求項 1 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 3】

前記第 I X 因子が、野生型第 I X 因子タンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 4】

前記双方向性核酸構築物が、一本鎖または二本鎖である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 5】

前記双方向性核酸構築物が、第ⅠX因子のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項6】

第ⅠX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法に使用するための請求項1～5のいずれか1項に記載の双方向性核酸構築物を含む組成物であって、

前記方法が、

i) 請求項1～5のいずれか1項に記載の双方向性核酸構築物と、

ii) Cas9ヌクレアーゼまたはCas9ヌクレアーゼをコードする核酸であるRNAガイドDNA結合剤と、

iii) セーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイドRNA (gRNA) とを細胞または細胞集団に送達することを含む、組成物。

10

【請求項7】

前記セーフハーバー遺伝子座がアルブミン遺伝子座である、請求項6に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項8】

前記gRNAが、配列番号40の配列を含む、請求項7に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項9】

gRNAが、以下の配列：

mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (配列番号72)
(式中、「mA」、「mC」、「mU」、及び「mG」は、2'-O-Meで置換されているヌクレオチドを表し、*は、ホスホロチオエート (PS) 結合を示す。)
を含む、請求項8に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

20

【請求項10】

前記送達が、インビトロである、請求項6～9のいずれか1項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

30

【請求項11】

前記双方向性核酸構築物、前記RNAガイドDNA結合剤、及び／または前記gRNAが、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、請求項6～10のいずれか1項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項12】

前記双方向性核酸構築物、前記RNAガイドDNA結合剤、及び／または前記gRNAが、ウイルスベクター中で投与される、請求項11に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項13】

前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項12に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

40

【請求項14】

前記AAVベクターが、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV-DJ、及びAAV2/8からなる群から選択される、請求項13に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項15】

前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9ヌクレアーゼである、請求項6～14のいずれか1項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項16】

前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9ヌクレアーゼをコードするmRNAである

50

、請求項 6 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 1 7】

前記 Cas 9 ヌクレアーゼが、S. pyogenes Cas 9 ヌクレアーゼである、請求項 6 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 1 8】

前記双方向性核酸構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、及び gRNA が、任意の順序及び／または任意の組み合わせで逐次的にまたは同時に投与される、請求項 6 ～ 1 7 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 1 9】

前記 RNA ガイド DNA 結合剤が、部位特異的 DNA 結合活性を有する、請求項 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

10

【請求項 2 0】

第 I X 因子核酸が導入された前記細胞または細胞集団が、異種シグナルペプチドを有する第 I X 因子を発現する、請求項 6 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 1】

第 I X 因子核酸が導入された前記細胞または細胞集団が、アルブミンシグナルペプチドを有する第 I X 因子を発現する、請求項 2 0 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 2】

第 I X 因子核酸が導入された前記細胞または細胞集団が、第 I X 因子シグナルペプチドを有する第 I X 因子を発現する、請求項 6 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

20

【請求項 2 3】

前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞または肝臓細胞集団であるか、または肝臓細胞または肝臓細胞集団を含む、請求項 6 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 4】

前記肝臓細胞または肝臓細胞集団が、肝細胞または肝細胞集団である、請求項 2 3 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

30

【請求項 2 5】

前記双方向性核酸構築物、RNA ガイド DNA 結合剤、及び gRNA が、任意の組み合わせで、互いに 1 時間以内に投与される、請求項 6 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 6】

第 I X 因子欠乏症を治療する方法に使用するための請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物を含む組成物であって、

前記方法が、前記第 I X 因子欠乏症を有する個体に、

i) 前記双方向性核酸構築物と、

ii) Cas 9 ヌクレアーゼまたは Cas 9 ヌクレアーゼをコードする核酸と、

iii) セーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイド RNA (gRNA) と、を投与することを含む、組成物。

40

【請求項 2 7】

前記治療が、治療有効量の前記第 I X 因子タンパク質を発現することを含む、請求項 2 6 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 8】

前記治療が、前記個体において治療有効レベルの循環第 I X 因子凝固活性を達成することを含む、請求項 2 6 または 2 7 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 2 9】

50

前記個体が、ヒトである、請求項 26～28 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 30】

前記治療が、正常の少なくとも約 1 % の循環第 I X 因子活性またはヒト第 I X 因子タンパク質レベルを達成することをさらに含む、請求項 29 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 31】

循環第 I X 因子活性またはヒト第 I X 因子タンパク質レベルが、正常の約 150 % 未満である、請求項 29 または 30 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 32】

前記治療が、正常の少なくとも約 1 % ～約 150 % の循環第 I X 因子活性またはヒト第 I X 因子タンパク質レベルを達成することをさらに含む、請求項 29 または 30 に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 33】

前記治療が、前記個体のベースライン第 I X 因子活性を上回る、正常第 I X 因子活性の少なくとも約 1 % の第 I X 因子活性の増加を達成することをさらに含む、請求項 29～32 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 34】

前記治療が、前記個体のベースライン第 I X 因子活性を上回る、正常第 I X 因子活性の少なくとも約 50 % の第 I X 因子活性の増加を達成することをさらに含む、請求項 29～33 のいずれか 1 項に記載の使用のための双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 35】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物を含む、ベクター。

【請求項 36】

前記ベクターが、ウイルスペクターである、請求項 35 に記載のベクター。

【請求項 37】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物を含む、脂質ナノ粒子。

【請求項 38】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物を含む、細胞。

【請求項 39】

第 I X 因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法に使用するための、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物。

【請求項 40】

第 I X 因子欠乏症を治療する方法に使用するための、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物を含む組成物。

【請求項 41】

i) 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の双方向性核酸構築物と、

ii) Cas9ヌクレアーゼまたはCas9ヌクレアーゼをコードする核酸と、

iii) セーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイドRNA (gRNA) とを含む、第 I X 因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法に使用するためのキットまたは組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2018年10月18日に出願された米国仮出願第62/747,509号、2019年4月3日に出願された米国仮出願第62/829,009号、2019年4月4日に出願された米国仮出願第62/829,621号、及び2019年4月29日に出願された米国仮出願第62/840,352号から優先権の利益を主張する。前述の出願の各々の明細書は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

出血障害は、不十分な血液凝固によって引き起こされる。この欠乏症は、先天性凝固障害、後天性凝固障害、または外傷によって誘発される出血状態によって引き起こされ得る。出血は、疾患の最も深刻で重大な症状のうちの1つであり、局所部位から発生し得るか、または全身に広がり得る。局所的な出血は、病変と関連付けられ得、欠陥のある止血機序によってさらに複雑になり得る。凝固因子のうちのいずれかの先天性または後天性欠乏症は、出血傾向と関連付けられ得る。出血障害の典型的な例としては、第ⅤⅢⅢⅢ因子の欠乏症から生じる血友病A、または第ⅠⅩ因子の欠乏症から生じる血友病B（クリスマス病）などの血友病が挙げられる。血友病は全ての人種及び民族で発生し、アメリカ及び世界中の多くの人々に影響する。

10

【0003】

出血障害の従来の療法には、第ⅤⅢⅢⅢ因子、第ⅤⅢⅢⅢ因子、または第ⅠⅩ因子などの欠乏する凝固因子の非経口置換が含まれる。例えば、血友病Bの現在の治療は、精製された組換え第ⅠⅩ因子の慢性的かつ反復的な静脈内注入に依存する。しかしながら、これらの治療には、反復的な静脈内注入の必要性、阻害剤形成と関連していること、及び概して治癒的というよりも予防的であることを含むいくつかの欠点がある。例えば、P e t r i n i 2001, Hemophilia 7:99、F i s c h e r e t a l . 2002, Blood 99(7):2337を参照されたい。

【発明の概要】

【0004】

喪失または欠損遺伝子のコピーを患者に導入することを含む遺伝子療法は、第ⅠⅩ因子を患者により長期間導入する1つの可能な方法を提供する。しかしながら、第ⅠⅩ因子の改善された長期発現を提供する追加の組成物及び方法が必要とされている。

20

【0005】

本開示は、宿主細胞または宿主細胞集団（インビトロまたはインビボ）において第ⅠⅩ因子を発現するため、及び血友病（例えば、血友病B）を治療するために有用な組成物及び方法を提供する。第ⅠⅩ因子をコードする配列のヒトゲノム遺伝子座、例えば、アルブミンセーフハーバー部位などのセーフハーバー部位への標的挿入で使用するためのガイドRNAが本明細書に提供される。アルブミンセーフハーバー部位のイントロン1などのセーフハーバー部位への標的挿入で使用するための、第ⅠⅩ因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）もまた提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のガイドRNAは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）及び第ⅠⅩ因子導入遺伝子を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）と組み合わせて使用することができる。いくつかの実施形態では、ドナー構築物（例えば、双方向性構築物）は、遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）系）と共に使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示のガイドRNAは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）及び第ⅠⅩ因子導入遺伝子を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）と組み合わせて使用することができる。以下の実施形態が提供される。

30

【0006】

いくつかの態様では、i) 第ⅠⅩ因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、ii) RNAガイドDNA結合剤と、iii) 配列を含むガイドRNA（gRNA）とを投与することを含む、第ⅠⅩ因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34、40、45、5

40

50

1、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号98～119からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号98～119からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号120～163からなる群から選択される配列である配列を含む。

【0007】

いくつかの態様では、i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、ii) RNAガイドDNA結合剤と、iii) 配列を含むガイドRNA (gRNA) とを投与することを含む、細胞または細胞集団において第IX因子を発現する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号98～119からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号98～119からなる群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である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号120～163からなる群から選択される配列を含む。

【0008】

いくつかの態様では、i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、ii) RNAガイドDNA結合剤と、iii) 配列を含むガイドRNA (gRNA) とを投与することを含む、細胞または細胞集団において第IX因子を導入または発現する方法が本明細書に提供され、投与は、インビトロである。

【0009】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2

～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択される配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、核酸構築物は、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤及び／またはgRNAは、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される。いくつかの実施形態では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV-DJ、及びAAV2／8からなる群から選択される。

【0011】

いくつかの実施形態では、核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAは、任意の順序及び／または任意の組み合わせで逐次的に投与される。いくつかの実施形態では、核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAは、個々にまたは任意の組み合わせで、同時に投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤、または組み合わせたRNAガイドDNA結合剤及びgRNAは、核酸構築物を投与する前に投与される。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、gRNA及び／またはRNAガイドDNA結合剤を投与する前に投与される。

【0012】

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ヌクレアーゼは、クラス2のCasヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、S. pyogenes 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、ニッカーゼである。

【0013】

いくつかの実施形態では、核酸構築物は、双方向性核酸構築物である。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、一本鎖または二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、一本鎖DNAまたは二本鎖DNAである。いくつかの実施形態では、双方向性構築物は、第IX因子タンパク質の発現を促進するプロモーターを含まない。いくつかの実施形態では、細胞または細胞集団は、アルブミンシグナルペプチドなどの異種ペプチドを有する第IX因子を発現する。

【0014】

いくつかの実施形態では、細胞または細胞集団は、肝臓細胞を含む。いくつかの実施形態では、肝臓細胞は、肝細胞である。

【0015】

いくつかの実施形態では、核酸は、野生型第IX因子タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、変異体第IX因子タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、核酸は、変異R338Lを有する第IX因子タンパク質をコードする。

【0016】

いくつかの態様では、第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、第IX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法が本明細書に提供される。第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、細胞または細胞集団において第IX因子を発現する方法が本明細書に提供される。

【0017】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、a) 第IX因子のコード配列を含む第1のセグメント、及びb) 第IX因子のコード配列の逆相補体を含む第2のセグメントを含み、構築物は、第IX因子の発現を促進するプロモーターを含まない。いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、a) 第IX因子のコード配列を含む第1のセグメント、及びb) 第2のポリペプチドのコード配列の逆相補体を含む第2のセグメントを含み、構築物は、ポリペプチドの発現を促進するプロモーターを含まない。

【0018】

いくつかの実施形態では、第IX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法は、RNAガイドDNA結合剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、gRNAを投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される。いくつかの実施形態では、gRNAは、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される。いくつかの実施形態では、核酸ベクターは、ウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV-DJ、及びAAV2／8からなる群から選択される。

【0019】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAは、任意の順序及び／または任意の組み合わせで逐次的に投与される。いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAは、任意の組み合わせで、同時に投与される。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤、または組み合わせたRNAガイドDNA結合剤及びgRNAは、双方向性核酸構築物を投与する前に投与される。いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、gRNA及び／またはRNAガイドDNA結合剤を投与する前に投与される。

【0020】

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ヌクレアーゼは、クラス2のCasヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、S. pyogenesヌクレアーゼ、S. aureusヌクレアーゼ、C. jejuniヌクレアーゼ、S. thermophilusヌクレアーゼ、N. meningitidisヌクレアーゼ、及びそれらのバリエーションからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、Cas9である。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、ニッカーゼである。

【0021】

いくつかの実施形態では、双方向性構築物は、第IX因子タンパク質の発現を促進するプロモーターを含まない。いくつかの実施形態では、双方向性構築物は、一本鎖または二本鎖である。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、一本鎖DNAまたは二本鎖DNAである。いくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号2～33からなる群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、または配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、もしくは75%同一である配列を含む。

【0022】

いくつかの態様では、細胞において第IX因子を発現するのに使用するための組成物が本明細書に提供され、組成物は、i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、ii) RNAガイドDNA結合剤と、iii) 配列番号2～33からなる群から選択されるガイド配列、または配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含むガイドRNA (g

10

20

30

40

50

RNA) とを含む。細胞または細胞集団において第IX因子を発現するのに使用するための組成物が本明細書に提供され、組成物は、第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、先行実施形態のいずれかに記載の方法によって作製される。

【0023】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、非分裂細胞型である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、双方向性構築物によってコードされる第IX因子ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝細胞である。

【0024】

任意の上記方法の方法、構築物、または宿主細胞のいくつかの実施形態では、gRNAは、配列番号401を含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】AAVゲノムに表される構築物フォーマットを示す。SA=スプライスアクセプター、pA=ポリAシグナル配列、HA=相同性アーム、LHA=左相同性アーム、RHA=右相同性アーム

【図2】相同性アームを有さないベクターが、不死化肝臓細胞株(Hepa1-6)において有効ではないことを示す。200bpの相同性アームを含むプラスミドP00204に由来するscAAVは、分裂細胞においてhFIXの発現をもたらした。P00123(相同性アームを欠くscAAV)及びP00147(相同性アームを欠くssAAV双方向性構築物)に由来するAAVベクターの使用は、hFIXの検出可能な発現をもたらさなかった。

【図3】A及びBは、P00123、P00147、またはP00204に由来するベクターを使用した相同性アームあり及びなしの挿入テンプレートのインビボ試験の結果を示す。Aは、約60%のインデル形成によって測定した肝臓編集レベルが、CRISPR/Cas9成分を含むLNPで処置した動物の各群において検出されたことを示す。Bは、LNP処置と組み合わせた相同性アーム(P00147に由来する)なしでssAAVベクターを受けている動物が、血清において最高レベルのhFIX発現をもたらしたことを示す。

【図4A】相同性アームあり及びなしのssAAV挿入テンプレートのインビボ試験の結果を示す。標的挿入を、プラスミドP00350、P00356、P00362(示されるような非対称相同性アームを有する)、及びP00147(図4Bに示されるような双方向性構築物)に由来するベクターと比較する。

【図4B】相同性アームあり及びなしのssAAV挿入テンプレートのインビボ試験の結果を示す。標的化された第2の部位への挿入を、プラスミドP00353、P00354(示されるような対称相同性アームを有する)、及びP00147に由来するベクターと比較する。

【図5A】初代マウス肝細胞における20個の標的部位にわたる双方向性構築物の標的挿入の結果を示す。試験されたベクターの各々の概略図を示す。

【図5B】初代マウス肝細胞における20個の標的部位にわたる双方向性構築物の標的挿入の結果を示す。試験された各組み合わせにわたる処置群の各々について、インデル形成によって測定された編集を示す。

【図5C】初代マウス肝細胞における20個の標的部位にわたる双方向性構築物の標的挿入の結果を示す。有意なレベルの編集(特定の標的部位でのインデル形成として)が、必ずしも導入遺伝子のより効率的な挿入または発現をもたらさなかったことを示す。hSA=ヒトF9スプライスアクセプター、mSA=マウスアルブミンスプライスアクセプター、HiBit=ルシフェラーゼに基づく検出のためのタグ、pA=ポリAシグナル配列、Nluc=ナノルシフェラーゼレポーター、GFP=緑色蛍光レポーター。

【図5D】初代マウス肝細胞における20個の標的部位にわたる双方向性構築物の標的挿

10

20

30

40

50

入の結果を示す。有意なレベルの編集（特定の標的部位でのインデル形成として）が、必ずしも導入遺伝子のより効率的な挿入または発現をもたらさなかったことを示す。h S A = ヒト F 9 スプライスアクセプター、m S A = マウスアルブミンスプライスアクセプター、H i B i t = ルシフェラーゼに基づく検出のためのタグ、p A = ポリ A シグナル配列、N l u c = ナノルシフェラーゼレポーター、G F P = 緑色蛍光レポーター。

【図 6】P 0 0 1 4 7 に由来する s s A A V を用いる 1 0 の標的部位にわたる双方向性構築物による標的挿入のインビボスクリーニングの結果を示す。示されるように、著しいレベルのインデル形成は、必ずしも高レベルの導入遺伝子発現をもたらすものではない。

【図 7 A】図 7 A ~ 7 D は、P 0 0 1 4 7 に由来する s s A A V を使用した 2 0 の標的部位にわたる双方向性構築物のインビボスクリーニングの結果を示す。A は、インデル形成によって測定される様々なレベルの編集が、試験した各 L N P / ベクターの組み合わせにわたって、処置群の各々について検出されたことを示す。

10

【図 7 B】図 7 A ~ 7 D は、P 0 0 1 4 7 に由来する s s A A V を使用した 2 0 の標的部位にわたる双方向性構築物のインビボスクリーニングの結果を示す。B は、対応する標的挿入データを提供する。結果は、インデル形成と双方向性構築物の挿入または発現との間の不十分な相関を示す。

【図 7 C】図 7 A ~ 7 D は、P 0 0 1 4 7 に由来する s s A A V を使用した 2 0 の標的部位にわたる双方向性構築物のインビボスクリーニングの結果を示す。C では、結果は、インビトロ結果とインビボ結果との間の正の相関を示す。

【図 7 D】図 7 A ~ 7 D は、P 0 0 1 4 7 に由来する s s A A V を使用した 2 0 の標的部位にわたる双方向性構築物のインビボスクリーニングの結果を示す。D では、結果は、インデル形成と双方向性構築物の挿入または発現との間の不十分な相関を示す。

20

【図 8 A】h F I X 導入遺伝子とマウスアルブミンエクソン 1 配列との間の接合部を検出することができるプローブを使用した i n s i t u ハイブリダイゼーション法を使用した、細胞レベルでの双方向性構築物の挿入を示す。

【図 8 B】循環 h F I X レベルは、ハイブリッド転写産物に対して陽性であった細胞の数と相関していた。

【図 9】双方向性 h F I X 構築物を含む s s A A V の送達と L N P の送達との間の様々なタイミングの標的挿入に対する効果を示す。

【図 1 0】双方向性 h F I X 構築物の送達後の、様々な回数（例えば、1、2、または 3）の L N P 投与の標的挿入に対する効果を示す。

30

【図 1 1 A】インビボでの h F I X 発現の耐久性を示す。

【図 1 1 B】アルブミンのイントロン 1 からの発現が維持されたことを示す。

【図 1 2 A】A A V または L N P 用量を変化させることにより、インビボでのアルブミン遺伝子のイントロン 1 からの h F I X の発現の量を調節することができることを示す。

【図 1 2 B】A A V または L N P 用量を変化させることにより、インビボでのアルブミン遺伝子のイントロン 1 からの h F I X の発現の量を調節することができることを示す。

【図 1 3 A】初代カニクイザル肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニングした結果を示す。試料の各々について検出されたインデル形成によって測定された様々なレベルの編集を示す。

40

【図 1 3 B】初代カニクイザル肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニングした結果を示す。著しいレベルのインデル形成が、アルブミンのイントロン 1 への双方向性構築物の挿入または発現について予測的でなかったことを示す。

【図 1 3 C】初代カニクイザル肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニングした結果を示す。著しいレベルのインデル形成が、アルブミンのイントロン 1 への双方向性構築物の挿入または発現について予測的でなかったことを示す。

【図 1 4 A】初代ヒト肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニングした結果を示す。試料の各々について検出されたインデル形成によって測定された編集を示す。

【図 1 4 B】初代ヒト肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニング

50

した結果を示す。著しいレベルのインデル形成が、アルブミン遺伝子のイントロン1への双方向性構築物の挿入または発現について予測的でなかったことを示す。

【図14C】初代ヒト肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物をスクリーニングした結果を示す。著しいレベルのインデル形成が、アルブミン遺伝子のイントロン1への双方向性構築物の挿入または発現について予測的でなかったことを示す。

【図14D】著しいレベルのインデル形成が、アルブミン遺伝子のイントロン1への双方向性構築物の挿入または発現について予測的でなかったことを示す。

【図15】非ヒト霊長類が双方向性hFIX挿入テンプレート（P00147に由来する）と共にLNPを投与されたインビボ研究の結果を示す。全身hFIXレベルは、LNP及びAAVの両方で処置された動物においてのみ達成され、AAVまたはLNP単独を使用して検出可能なhFIXはなかった。

10

【図16A】注射後6週目の血漿試料中のヒト第IX因子発現レベルを示す。

【図16B】注射後6週目の血漿試料中のヒト第IX因子発現レベルを示す。

【図17】各動物の複数の葉にわたる7週目の血清レベル及び陽性細胞%を示す。

【図18】注射後1、2、及び4週目での各群における血漿試料中のヒト第IX因子発現レベルを示す。

【図19】aPTTアッセイにおけるhF9導入遺伝子の挿入及び凝固機能を示す。

【図20】A及びBは、TGA-EA分析におけるhF9導入遺伝子の挿入及びトロンビン生成を示す。

【図21】hF9導入遺伝子の挿入及びトロンビン生成を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

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、添付の実施形態によって定義される本発明内に含まれ得る全ての代替物、改変物、及び均等物を網羅することが意図される。

【0027】

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。本明細書及び添付の実施形態で使用されるように、単数形「a」、「an」、及び「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、「複合体（a conjugate）」への言及は、複数の複合体を含み、「細胞（a cell）」への言及は、複数の細胞または細胞集団などを含む。本明細書で使用される「含む（include）」という用語及びその文法上の変形は、リスト内の項目の列挙が、リストされた項目に置換または追加することができる他の同様の項目を除外しないように、非限定的であることを意図する。

30

【0028】

数値範囲には、その範囲を定義する数値が含まれる。測定値及び測定可能な値は、有効桁及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）」、及び「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、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。

40

【0029】

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

50

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

10

【0030】

「約」という用語は、リストの前に使用される場合、リストの各要素を修飾する。「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。

【0031】

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資料が、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。

【0032】

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及び句は、以下の意味を有することを意図する。

20

【0033】

「ポリヌクレオチド」及び「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アナログを有するヌクレオシドまたはヌクレオシドアナログ (従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、及びそれらのアナログであるポリマーを含む) を含む多量体化合物を指すために本明細書で使用される。核酸「骨格」は、糖ホスホジエステル連結、ペプチド-核酸結合 (「ペプチド核酸」またはPNA、PCT第WO95/32305号)、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上を含む、様々な連結から構成され得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または置換、例えば、2'メトキシまたは2'ハロゲン化物置換を有する類似の化合物であり得る。窒素系塩基は、従来の塩基 (A、G、C、T、U)、そのアナログ (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などの修飾ウリジン、またはその他のもの)、イノシン、プリンもしくはピリミジンの誘導体 (例えば、N⁴-メチルデオキシグアノシン、デアザーもしくはアザープリン、デアザーもしくはアザーピリミジン、5位もしくは6位に置換基を有するピリミジン塩基 (例えば、5-メチルシトシン)、2、6、もしくは8位に置換基を有するプリン塩基、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O⁶-メチルグアニン、4-チオーピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、及びO⁴-アルキル-ピリミジン、米国特許第5,378,825号及びPCT第WO93/13121号)であってよい。一般的な考察については、The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992を参照されたい)。核酸は、骨格がポリマーの位置 (複数可) 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、及び連結のみを含んでもよく、または従来の構成要素及び置換の両方 (例えば、2'メトキシ連結を有する従来の塩基、または従来の塩基及び1つ以上の塩基アナログ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及び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

30

40

50

LNAヌクレオチドモノマーを含有するアナログである「ロックド核酸」(LNA)を含む(Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42):13233-41)。RNA及びDNAは異なる糖部分を有し、RNA内のウラシルもしくはそのアナログ及びDNA内のチミンもしくはそのアナログの存在によって異なり得る。

【0034】

「ガイドRNA」、「gRNA」、及び単に「ガイド」は、ガイド配列、例えば、crRNA(CRISPR RNAとしても知られる)を含むガイド、またはcrRNA及びtrRNAの組み合わせ(tracrRNAとしても知られる)のいずれかを指すために、本明細書で互換的に使用される。crRNA及び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、または例えば、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変異を有するtrRNA配列であり得る。sgRNAまたはdgRNAなどのガイドRNAは、本明細書に記載されるような修飾RNAを含み得る。

【0035】

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)及び関連する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、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することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ガイド配列は、配列番号2~33から選択される配列の少なくとも15、16、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、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2~33から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、もしくは20個の連続ヌクレオチドと約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、ガイド配列及び標的領域は、100%相補的または同一であり得る。他の実施形態では、ガイド配列及び標的領域とは、少なくとも1個のミスマッチを含んでもよい。例えば、ガイド配列及び標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでもよく、標的配列の全長は、少なくとも15、16、17、18、19、20個以上の塩基対である。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的配列は、1~4個のミスマッチを含んでもよく、ガイド配列は、少なくとも15、16、17、18、19、20個以上のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ガイド配列及び標的配列は、1、2、3、または4個のミスマッチを含んでもよく、ガイド配列は、20個のヌクレオチドを含む。

【0036】

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、ガイド配列は、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。

【0037】

本明細書で使用される場合、「RNAガイドDNA結合剤」は、RNA及び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。RNAガイドDNA結合剤という用語は、そのようなポリペプチドをコードする核酸も含む。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、Casクリベース／ニッカーゼが含まれる。例示的なRNAガイドDNA結合剤には、その不活性化形態（「dCas DNA結合剤」）が含まれ得る（例えば、これらの薬剤が、例えば、FokIクリベースドメインとの融合を介して、DNA切断を可能にするように修飾された場合）。本明細書で使用される「Casヌクレアーゼ」は、Casクリベース及びCasニッカーゼを包含する。Casクリベース及びCasニッカーゼには、III型CRISPR系のCsmもしくはCmr複合体、そのCas10、Csm1、または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、及びクラス2のCas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の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2のCasヌクレアーゼには、RNAガイドDNAクリベースもしくはニッカーゼ活性をさらに有するクラス2のCasクリベース／ニッカーゼ（例えば、H840A、D10A、またはN863Aバリエーション）、クリベース／ニッカーゼ活性が不活性化されたクラス2のdCas DNA結合剤（それらの薬剤がDNA切断を可能にするように修飾される場合）が含まれる。クラス2の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バリエーション）、HypaCas9（例えば、N692A、M694A、Q695A、H698Aバリエーション）、eSPCas9（1.0）（例えば、K810A、K1003A、R1060Aバリエーション）、及びeSPCas9（1.1）（例えば、K848A、K1003A、R1060Aバリエーション）タンパク質、ならびにそれらの修飾が含まれる。Cpf1タンパク質（Zetsche et al., Cell, 163:1-13（2015））もまた、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及びS3を参照されたい。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。本明細書で使用する場合、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ、Cas9ヌクレアーゼ、またはS. pyogenes Cas9ヌクレアーゼ）の送達は、ポリペプチドまたはmRNAの送達を含む。

【0038】

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クリベース、Casニッカーゼ、またはdCas DNA結合剤（例えば、Cas9）と合わせたガイドRNAを指す。いくつかの実施形態では、ガイド配列は、Cas9などのRNAガイドDNA結合剤を標的配列へと誘導し、ガイドRNAが標的配列とハイブリダイズし、薬剤が標的配列と結合し、薬剤がクリベースまたはニッカーゼである場合、結合後に切断またはニックングを行うことができる。

【0039】

本明細書で使用する場合、第2の配列に対する第1の配列のアライメントにより、第2の配列の位置の全体でのX%以上が第1の配列によって一致することが示される場合、第1の配列は、第2の配列と「少なくともX%の同一性を有する配列を含む」とみなされる。例えば、配列AAGAは、配列AAGと100%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%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）、及び修飾ウリジンなどのヌクレオシドアナログの存在は、関連するヌクレオチド（チミジン、ウリジン、または修飾ウリジンなど）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、シトシン及び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。例示的なアライメントアルゴリズムは、当該技術分野で周知である、Smith-Waterman及びNeedleman-Wunschアルゴリズムである。当業者は、アライ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及びパラメータ設定の選択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及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るNeedleman-Wunschアルゴリズムが一般的に適切である。

【0040】

本明細書で使用される場合、第1の配列は、第1の配列の塩基のX%が第2の配列と塩基対合する場合、第2の配列に対して「X%相補的」とであるとみなされる。例えば、第1の配列5' AAGA3'は、第2の配列3' TTCT5'と100%相補的であり、第2の配列は、第1の配列に対して100%相補的である。いくつかの実施形態では、第1の配列5' AAGA3'は、第2の配列3' TTCTGTGA5'と100%相補的であるが、一方、第2の配列は、第1の配列に対して50%相補的である。

【0041】

本明細書で使用される場合、「mRNA」は、全体的にまたは主にRNAまたは修飾RNAであり、かつポリペプチドに翻訳することができる（すなわち、リボソーム及びアミノアシル化tRNAによる翻訳のための基質として機能することができる）オープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを指すために本明細書で使用される。mRNAは、リボース残基またはそのアナログ、例えば、2'-メトキシリボース残基を含む、リン酸糖骨格を含み得る。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。

【0042】

本明細書に記載のガイドRNA組成物及び方法に有用なガイド配列を、本出願全体を通して表1に示す。

【0043】

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いくつかのヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を指す。

【0044】

本明細書で使用される場合、「第IX因子」は、「FIX」または「F9」と互換的に使用され、クリスマス因子としても既知である。ヒト野生型第IX因子タンパク質配列は、NCBI NP_000124で入手可能であり、遺伝子配列は、NCBI NM_000133で入手可能である。第IX因子タンパク質配列の例は、本明細書に記載される（例えば、配列番号700、配列番号701、及び／または配列番号702）。本明細書で使用される場合、第IX因子はまた、第IX因子のバリエント、例えば、野生型第IX因子と比較して増加した凝固活性を有するバリエントを包含する。第IX因子の活動亢進型バリエントは、R338の置換を含み得る。そのようなバリエント第IX因子の例には、配列番号701に対して変異R338Lを含む。活動亢進型及び機能亢進型という用語は

、本明細書で互換的に使用される。バリエーション第ⅠⅩ因子のさらなる例には、アラニン、ロイシン、バリン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、セリン、及びトレオニンから選択される残基 338 のアミノ酸が含まれる。さらなる第ⅠⅩ因子バリエーションには、ロイシン、システイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、またはチロシンから選択される残基 338 のアミノ酸が含まれる。本明細書で使用される場合、第ⅠⅩ因子はまた、配列番号 700 と 80%、85%、90%、93%、95%、97%、99% 同一であり、かつ野生型第ⅠⅩ因子と比較して、少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100% 以上の活性を有するバリエーションを包含する。本明細書で使用される場合、第ⅠⅩ因子はまた、配列番号 700 と 80%、85%、90%、93%、95%、97%、99% 同一であり、かつ配列番号 701 または配列番号 702 と比較して、少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100% 以上の活性を有するバリエーションを包含する。本明細書で使用される場合、第ⅠⅩ因子はまた、野生型第ⅠⅩ因子と比較して、少なくとも 80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100% 以上の活性を有する断片を包含する。いくつかの実施形態では、第ⅠⅩ因子バリエーションは、活動亢進型第ⅠⅩ因子バリエーションであり得る。ある特定の例では、第ⅠⅩ因子バリエーションは、野生型第ⅠⅩ因子と比較して、約 80%～約 100%、120%、140%、160%、180%、または 200% の活性を有する。第ⅠⅩ因子バリエーションの特異的活性は、例えば、実施例 13 に記載されるように、その機能的に正規化された活性を計算するために使用することができる。第ⅠⅩ因子バリエーション、例えば、R338L の特異的活性は、文献において既知であり、既知の方法を使用して計算することができる。機能亢進型第ⅠⅩ因子バリエーションは、対応する野生型第ⅠⅩ因子タンパク質の約 1.2、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12、または 15 倍の特異的活性を有し得る。一実施形態では、機能亢進型第ⅠⅩ因子は、対応する野生型第ⅠⅩ因子タンパク質の約 8～12 倍の特異的活性を有し得る。別の実施形態では、機能亢進型第ⅠⅩ因子は、対応する野生型第ⅠⅩ因子タンパク質の 1.2～5 倍の特異的活性を有し得る。例示的な配列は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第 4,770,999 号、同第 4,994,371 号、同第 5,521,070 号、同第 6,046,380 号、同第 6,531,298 号、及び同第 8,383,388 号の配列を含む。

【0045】

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）ニッキングまたは切断するように指向される。

【0046】

本明細書で使用される場合、「血友病」は、喪失または欠損第ⅠⅩ因子遺伝子またはポリペプチドによって引き起こされる障害を指す。障害は、遺伝性及び／または後天性（例えば、遺伝子における自発的変異によって引き起こされる）状態を含み、血友病 B を含む。いくつかの実施形態では、欠損第ⅠⅩ因子遺伝子またはポリペプチドは、血漿中の第ⅠⅩ因子レベルの低下及び／または第ⅠⅩ因子の凝固活性の低下をもたらす。本明細書で使用される場合、血友病は、軽度、中等度、及び重度の血友病を含む。例えば、約 1% 未満の活性因子を有する個体は、重度の血友病を有するとして分類され、約 1～5% の活性因子を有する個体は、中等度の血友病を有し、軽度の血友病を有する個体は、活性凝固因子の正常レベルの約 5～40% を有するとして分類される。

【0047】

本明細書で使用される場合、「正常」または「健康」である個体には、正常な第ⅠⅩ因子活性のプール血漿レベル及び抗原レベルの 50～160% を有する個体が含まれる。ヒト血漿からのその精製に基づいて、正常な成人における第ⅠⅩ因子の濃度（第ⅠⅩ因子の正常プール血漿レベル）は、血漿 ml あたり約 300～400 μ g である。いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態では、第ⅠX因子、例えば、循環第ⅠX因子のレベルは、凝固及び／または免疫学的アッセイ、例えば、サンドイッチ免疫アッセイ、ELISA（例えば、実施例13を参照されたい）、MSD（例えば、実施例14を参照されたい）によって測定され得る。第ⅠX因子の凝固促進活性は、患者の血漿が第ⅠX因子欠損血漿の凝固時間を補正する能力によって決定される。

【0048】

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

10

【0049】

本明細書で使用される場合、「双方向性核酸構築物」（本明細書では「双方向性構築物」と互換的に称される）は、少なくとも2つの核酸セグメントを含み、一方のセグメント（第1のセグメント）は、目的のポリペプチドをコードするコード配列（コード配列は、本明細書では「導入遺伝子」または第1の導入遺伝子と称され得る）を含むが、もう一方のセグメント（第2のセグメント）は、配列の相補体が目的のポリペプチドをコードする配列、つまり第2の導入遺伝子を含む。すなわち、少なくとも2つのセグメントは、同一または異なるポリペプチドをコードすることができる。2つのセグメントが同一のポリペプチドをコードする場合、第1のセグメントのコード配列は、第2のセグメントの配列の相補体と同一である必要はない。いくつかの実施形態では、第2のセグメントの配列は、第1のセグメントのコード配列の逆相補体である。双方向性構築物は、一本鎖または二本鎖であり得る。本明細書に開示される双方向性構築物は、目的の任意のポリペプチドを発現することができる構築物を包含する。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、第1のポリペプチドをコードするコード配列（第1の導入遺伝子）を含む第1のセグメントと、配列の相補体が第2のポリペプチドをコードする配列（第2の導入遺伝子）を含む第2のセグメントとを含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2のポリペプチドは、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。いくつかの実施形態では、第1及び第2のポリペプチドは、例えば、50、100、200、500、1000以上のアミノ酸残基にわたって、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0051】

本明細書で使用される場合、「逆相補体」は、参照配列の相補配列である配列を指し、相補配列は、逆方向で書かれている。例えば、仮定配列5'CTGGACCGA3'（配列番号500）について、「完璧な」相補配列は、3'GACCTGGCT5'（配列番号501）であり、「完璧な」逆相補配列は、5'TCGGTCCAG3'（配列番号502）と書かれている。逆相補配列は、「完璧」である必要はなく、依然として、参照配列と同じポリペプチドまたは類似のポリペプチドをコードし得る。コドン使用頻度の冗長性のため、逆相補体は、同じポリペプチドをコードする参照配列から逸脱し得る。本明細書で使用される場合、「逆相補体」はまた、参照配列の逆相補体配列と、例えば、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である配列を含む。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、野生型タンパク質またはバリエーションタンパク質（例えば、変異体、断片、融合、またはそれらの組み合わせ）を指す。バリア

50

ントポリペプチドは、野生型ポリペプチドの少なくともまたは約5%、10%、15%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%の機能活性を有し得る。いくつかの実施形態では、バリエーションは、野生型ポリペプチドの配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である。いくつかの実施形態では、バリエーションポリペプチドは、活動亢進型バリエーションであり得る。ある特定の例では、バリエーションは、野生型ポリペプチドの機能活性の約80%〜約120%、140%、160%、180%、200%、300%、400%、500%以上を有する。

【0053】

本明細書で使用される場合、「異種遺伝子」は、宿主細胞ゲノム内の部位（例えば、アルブミンイントロン1部位を含むセーフハーバー遺伝子座などのゲノム遺伝子座において）への外因性源として導入されている遺伝子を指す。すなわち、導入された遺伝子は、その挿入部位に関して異種である。そのような異種遺伝子から発現されるポリペプチドは、「異種ポリペプチド」と称される。異種遺伝子は、天然に存在するか、または操作されることができ、野生型またはバリエーションであり得る。異種遺伝子は、異種ポリペプチド（例えば、内部リボソーム侵入部位）をコードする配列以外のヌクレオチド配列を含み得る。異種遺伝子は、野生型またはバリエーション（例えば、変異体）として宿主ゲノム内で天然に存在する遺伝子であり得る。例えば、宿主細胞は（野生型としてまたはバリエーションとして）目的の遺伝子を含むが、同じ遺伝子またはそのバリエーションは、例えば、高度に発現される遺伝子座での発現のための外因性源として導入され得る。異種遺伝子はまた、宿主ゲノムにおいて天然に存在しない、または宿主ゲノムにおいて天然に存在しない異種ポリペプチドを発現する遺伝子であり得る。「異種遺伝子」、「外因性遺伝子」、及び「導入遺伝子」は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、異種遺伝子または導入遺伝子は、外因性核酸配列を含み、例えば、核酸配列は、レシピエント細胞に対して内因性ではない。いくつかの実施形態では、異種遺伝子または導入遺伝子は、外因性核酸配列、例えば、レシピエント細胞において天然に存在しない核酸配列を含む。例えば、異種遺伝子は、その挿入部位に関して、及びそのレシピエント細胞に関して異種であり得る。

【0054】

「セーフハーバー」遺伝子座は、ゲノム内の遺伝子座であり、遺伝子は、例えば、アポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、または対照細胞と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、もしくは40%を超えるアポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、宿主細胞、例えば、肝細胞に対する著しい有害作用なく、挿入され得る。例えば、Hsin et al., "Hepatocyte death in liver inflammation, fibrosis, and tumorigenesis," 2017を参照されたい。いくつかの実施形態では、セーフハーバー遺伝子座は、例えば、アポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、または対照細胞と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、もしくは40%を超えるアポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、宿主細胞、例えば、肝細胞に対する著しい有害作用なく、外因性遺伝子の過剰発現を可能にする。いくつかの実施形態では、望ましいセーフハーバー遺伝子座は、挿入された遺伝子配列の発現が隣接する遺伝子からのリードスルー発現によって乱されない遺伝子座であり得る。セーフハーバーは、ヒトアルブミン遺伝子などのアルブミン遺伝子内にあり得る。セーフハーバーは、アルブミンイントロン1領域、例えば、ヒトアルブミンイントロン1内にあり得る。セーフハーバーは、例えば、肝組織または肝細胞宿主細胞のヒトセーフハーバーであり得る。いくつかの実施形態では、セーフハーバーは、例えば、アポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、または対照細胞もしくは細胞集団と比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、もしくは40%を超えるアポトーシス、壊死、及び／または老化を引き起こすことなく、肝細胞または肝臓細胞などの、宿主細胞または細胞集団に対する著しい有害作用なく、外因性遺伝子の過剰発現を可

10

20

30

40

50

能にする。

【0055】

II. 組成物

A. ガイドRNA (gRNA) を含む組成物

ゲノム遺伝子座、例えば、宿主細胞または宿主細胞集団のセーフハーバー部位内に第IX因子遺伝子を挿入及び発現するのに有用なガイドRNA組成物及び方法が本明細書に提供される。特に、本明細書に例示されるように、アルブミン遺伝子座（例えば、イントロン1）における外因性遺伝子の標的化及び挿入は、アルブミンの内因性プロモーターの使用を可能にし、外因性遺伝子のロバストな発現を促進する。本開示は、アルブミン遺伝子のイントロン1内の部位を特異的に標的とし、かつ第IX因子遺伝子の効率的な挿入及び発現を提供するガイドRNAの同定に部分的に基づく。実施例に示され、本明細書にさらに記載されるように、インデル形成活性により測定された高レベルの編集を媒介する同定されたgRNAの能力は、意外に、例えば、導入遺伝子の発現により測定された導入遺伝子の効率的な挿入を媒介するための同じgRNAの使用と必ずしも相関するものではない。すなわち、高レベルのインデル形成を達成することができるある特定のgRNAは、必ずしも効率的な挿入を媒介することができるわけではなく、逆に、低レベルのインデル形成を達成することが示されるいくつかのgRNAは、導入遺伝子の効率的な挿入及び発現を媒介し得る。

【0056】

いくつかの実施形態では、宿主細胞のアルブミン遺伝子座（例えば、イントロン1）の領域内に第IX因子遺伝子を挿入及び発現するのに有用な組成物及び方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、例えば、RNAガイドDNA結合剤、及び異種第IX因子核酸（「第IX因子導入遺伝子」）を含む構築物（例えば、ドナー構築物またはテンプレート）と共に本明細書に開示されるガイドRNAを使用して、宿主細胞のアルブミン遺伝子座内に異種第IX因子核酸を導入または挿入するのに有用な組成物が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、例えば、RNAガイドDNA結合剤及び異種第IX因子核酸を含む構築物（例えば、ドナー）と共に本明細書に開示されるガイドRNAを使用して、宿主細胞のアルブミン遺伝子座から異種第IX因子を発現するのに有用な組成物が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、例えば、RNAガイドDNA結合剤及び異種第IX因子核酸を含む双方向性構築物と共に本明細書に開示されるガイドRNAを使用して、宿主細胞のアルブミン遺伝子座から異種第IX因子を発現するのに有用な組成物が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、例えば、RNAガイドDNA結合剤（例えば、CRISPR/Cas系）と共に本明細書に開示されるガイドRNAを使用して、宿主細胞の血清アルブミン遺伝子内で切断（例えば、二本鎖切断（DSB）または一本鎖切断（ニック））を誘導するのに有用な組成物が本明細書に開示される。組成物は、インビトロまたはインビボで、例えば、血友病を治療するために使用され得る。

【0057】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、アルブミン遺伝子座のイントロン内で結合するか、または結合することができるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、ヒトアルブミン遺伝子（配列番号1）のイントロン1の領域内で結合する。ガイド配列の全ての塩基が列挙された領域内で結合しなければならないわけではないことが理解されよう。例えば、いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列の15、16、17、18、19、20個以上の塩基は、列挙された領域と結合する。例えば、いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列の15、16、17、18、19、20個以上の連続塩基は、列挙された領域と結合する。

【0058】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、ヒトアルブミンイントロン1（配列番号1）内の部位におけるRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）による標的的特異的切断を媒介する。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、当該領域に結合するか、または結合することができるガイド配列を含むことが理解さ

れよう。

【0059】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを有するガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。

【0061】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または20個の連続ヌクレオチドを有するガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、二本鎖切断（DSB

10

20

30

40

50

）をもたらす標的特異的切断を媒介する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、一本鎖切断（ニック）をもたらす標的特異的切断を媒介する。

【0063】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の上流の領域に結合する。当業者によって理解されるように、PAM配列は、標的配列を含む鎖の反対側の鎖上で生じる。すなわち、PAM配列は、標的鎖（ガイドRNAが結合する標的配列を含む鎖）の相補鎖上にある。いくつかの実施形態では、PAMは、NGG、NNGRRT、NNGRR（N）、NNAGAAW、NNNNG（A/C）TT、及びNNNNRYACからなる群から選択される。

【0064】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるガイドRNA配列は、PAM配列に隣接する配列に対して相補的である。

【0065】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列は、ヒト参照ゲノムhg38内の座標に従って本明細書の表から選択されるゲノム領域内の配列に対して相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列は、本明細書の表から選択されるゲノム領域内から5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個の連続ヌクレオチドを含む配列に対して相補的である配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNA配列は、本明細書の表から選択されるゲノム領域にわたる5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個の連続ヌクレオチドを含む配列に対して相補的である配列を含む。

【0066】

本明細書に開示されるガイドRNAは、二本鎖切断（DSB）をもたらす標的特異的切断を媒介する。本明細書に開示されるガイドRNAは、一本鎖切断（SSBまたはニック）をもたらす標的特異的切断を媒介する。

【0067】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、RNAガイドDNA結合剤（例えば、本明細書に開示されるようなCasヌクレアーゼ）による標的特異的切断を媒介し、アルブミン遺伝子のイントロン1内に異種第IX因子核酸の挿入をもたらす。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及び／または切断は、異種第IX因子遺伝子の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%の挿入速度をもたらす。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及び／または切断は、異種第IX因子核酸の少なくとも20%、少なくとも30%、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%の挿入速度をもたらす。挿入速度は、インビトロまたはインビボで測定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、挿入速度は、細胞集団内の挿入された第IX因子核酸を検出及び測定し、挿入された第IX因子核酸を含む集団のパーセンテージを計算することによって決定することができる。挿入速度を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、利用可能である。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、異種第IX因子遺伝子の5～10%、10～15%、15～20%、20～25%、25～30%、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%、95～99%、またはそれを超える%増加した発現を可能にする。異種第IX因子遺伝子の発現の増加は、インビトロまたはインビボで測定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、増加した発現は、第IX因子ポリペプチドレベルを検出及び測定し、レベルを例えば、細胞を治療する前、または対象への投与の前の第IX因子ポリペプチドレベルと比較することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、異種第IX因子遺伝子の発現

10

20

30

40

50

からもたらされる5～10%、10～15%、15～20%、20～25%、25～30%、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%、95～99%、またはそれを超える%増加した活性を可能にする。例えば、増加した活性は、凝固活性を検出及び測定し、活性を例えば、細胞を治療する前、または対象への投与の前の凝固活性と比較することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、増加した活性は、aPTTアッセイにおける凝固機能及び／またはTGA-EAアッセイにおけるトロンビン生成を評価することによって使用して決定され得る。そのような方法は利用可能であり、当該技術分野で既知である（例えば、Simioniet al, NEJM 2009）。

10

【0068】

表1に配列番号2～33で示されるガイド配列の各々は、crRNA及び／またはガイドRNAを形成するための追加のヌクレオチドをさらに含んでもよく、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400）。ゲノム座標は、ヒト参照ゲノムhg38に従う。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、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号401）またはGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号402）。

20

【0069】

表1の配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33のガイド配列の各々は、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400）。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、GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号401）またはGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC（配列番号402）。

30

【0070】

40

50

【表 1】

表 1: ヒトガイド RNA 配列及び染色体座標

ガイド ID	ガイド配列	ヒトゲノム座標 (hg38)	配列 番号:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	chr4:73405113-73405133	2
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAU	chr4:73405000-73405020	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAUAU	chr4:73404999-73405019	4
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	chr4:73404761-73404781	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	chr4:73404753-73404773	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	chr4:73404727-73404747	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	chr4:73404722-73404742	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	chr4:73404715-73404735	9
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	chr4:73404452-73404472	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	chr4:73404418-73404438	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAA	chr4:73405013-73405033	12
G009874	UAAUAAAUCAAACAUCU	chr4:73404561-73404581	13
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUUUU	chr4:73404478-73404498	14
G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	chr4:73404496-73404516	15
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	chr4:73404529-73404549	16
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	chr4:73404577-73404597	17
G012751	UAAUUUUUCUUUUGCGCACUA	chr4:73404620-73404640	18
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAU	chr4:73404664-73404684	19
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUA	chr4:73404665-73404685	20
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	chr4:73404803-73404823	21
G012755	AUUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	chr4:73404859-73404879	22
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	chr4:73404897-73404917	23
G012757	UGAAUUUAUUCUUCUGUUUAA	chr4:73404924-73404944	24
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	chr4:73404965-73404985	25
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUAC	chr4:73404453-73404473	26
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUUACCU	chr4:73404581-73404601	27
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	chr4:73404714-73404734	28
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	chr4:73404973-73404993	29
G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	chr4:73405094-73405114	30
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	chr4:73405107-73405127	31
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	chr4:73405108-73405128	32
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	chr4:73405114-73405134	33

【0071】

ガイド RNA は、t r RNA をさらに含み得る。本明細書に記載される各組成物及び方法の実施形態では、c r RNA 及び t r RNA は、シングル RNA (s g RNA) として会合してもよく、または別個の RNA 上にあってもよい (d g RNA)。s g RNA の文脈において、c r RNA 及び t r RNA 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。いくつかの実施形態では、s g RNA は、ホスホジエステル結合ではないヌクレオチド間の 1 つ以上の連結を含む。

【0072】

本明細書に記載される組成物、使用、及び方法の実施形態の各々では、ガイド RNA は、「デュアルガイド RNA」または「d g RNA」として 2 つの RNA 分子を含み得る。d g RNA は、例えば、表 1 に示されるガイド配列を含む c r RNA を含む第 1 の RNA

分子と、*t r R N A*を含む第2の*R N A*分子とを含む。第1の*R N A*分子及び第2の*R N A*分子は共有結合していなくてもよいが、*c r R N A*及び*t r R N A*の部分の間の塩基対合を介して*R N A*二本鎖を形成してもよい。

【0073】

本明細書に記載される組成物、使用、及び方法の実施形態の各々では、ガイド*R N A*は、「シングルガイド*R N A*」または「*s g R N A*」としてシングル*R N A*分子を含み得る。*s g R N A*は、*t r R N A*に共有結合した表1に示されるガイド配列を含む*c r R N A*（またはその一部分）を含み得る。*s g R N A*は、表1に示されるガイド配列のも15、16、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、*c r R N A*及び*t r R N A*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、*s g R N A*は、*c r R N A*及び*t r R N A*の部分の間の塩基対合によって、ステムループ構造を形成する。いくつかの実施形態では、*c r R N A*及び*t r R N A*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。

【0074】

いくつかの実施形態では、*t r R N A*は、天然に存在する*C R I S P R / C a s*系由来の*t r R N A*配列の全てまたは一部分を含み得る。いくつかの実施形態では、*t r R N A*は、先端切断または修飾された野生型*t r R N A*を含む。*t r R N A*の長さは、使用される*C R I S P R / C a s*系に依存する。いくつかの実施形態では、*t r R N A*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、もしくは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、*t r R N A*は、例えば、1つ以上のヘアピン構造もしくはステムループ構造、または1つ以上のバルジ構造などのある特定の二次構造を含み得る。

【0075】

いくつかの実施形態では、標的配列またはヒトアルブミン遺伝子座（配列番号1）のイントロン1内の領域は、ガイド*R N A*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*R N A*のガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも75%、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*g R N A*のガイド配列は、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*g R N A*のガイド配列は、少なくとも1個のミスマッチを含んでもよい。例えば、標的配列と*g R N A*のガイド配列は、1、2、3、4、または5個のミスマッチを含んでもよく、ここで、ガイド配列の全長は、約20または20である。いくつかの実施形態において、標的配列と*g R N A*のガイド配列は、1〜4個のミスマッチを含んでもよく、ここで、ガイド配列は、約20または20ヌクレオチドである。

【0076】

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、*R N A*ガイド*D N A*結合剤、例えば、本明細書に記載の*C a s*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（*O R F*）を含む*m R N A*を含む。いくつかの実施形態では、*R N A*ガイド*D N A*結合剤、例えば、*C a s*ヌクレアーゼをコードする*O R F*を含む*m R N A*が提供されるか、使用されるか、または投与される。

【0077】

B. 修飾*g R N A*及び*m R N A*

いくつかの実施形態では、*g R N A*は、化学修飾される。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*g R N A*は、標準的なA、G、C、及びU残基の代わりに、またはそれらに加えて使用される1つ以上の非天然及び／または天然に存在する構成要素または配置の存在を記載するために、「修飾」*g R N A*または「化学修飾」*g R N A*と呼ばれる。いくつかの実施形態では、修飾*g R N A*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。修飾ヌクレオシド及びヌクレオチドは、（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、及び／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）、（i i）リボース糖の成分、例えば、リボース糖の2'ヒドロキシルの改変、例えば、置き換え（例示的な糖修飾）、（i i i）リン酸部分の「脱リン酸型」リンカーによる大規模な置き換え（例示的な骨格修飾）、（i v）非標準的な核酸塩基によるものを含め、天然に存在する核酸塩基の修飾または置き換え（例示的な塩基修飾）、（v）リボースリン酸骨格の置き換えまたは修飾（例示的な骨格修飾）、（v i）オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾または置き換え、または部分、キャップ、また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、糖及び／または骨格の修飾を含み得る）、ならびに（v i i）糖の修飾または置き換え（例示的な糖修飾）の1つ以上を含み得る。

10

【0078】

上に列挙されるものなどの化学修飾を組み合わせて、2、3、4以上の修飾を有し得るヌクレオシド及びヌクレオチド（まとめて「残基」）を含む修飾gRNA及び／またはmRNAを提供することができる。例えば、修飾残基は、修飾糖及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基などの修飾リン酸基を有する。あ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。ある特定のgRNAは、RNAの5'末端及び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。

20

【0079】

いくつかの実施形態では、gRNAは、1、2、3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%）は、修飾ヌクレオシドまたはヌクレオチドである。

30

【0080】

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見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、一態様では、本明細書に記載されるgRNAは、例えば、細胞内または血清に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、インビボ及びエキシボの両方において細胞集団に導入されるとき、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）発現及び放出の誘導ならびに細胞死を含む、一本鎖核酸を含む外因性核酸に対する細胞応答を含む。

40

【0081】

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。

【0082】

修飾リン酸基の例には、ホスホロチオエート、ホスホロセネート、ボラノリン酸、ボラノリン酸エステル、水素ホスホネート、ホスホロアミデート、アルキルまたはアリール

50

ホスホネート、及びホスホトリエステルが含まれる。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R_p）または「S」配置（本明細書においてS_p）のいずれかを有し得る。骨格はまた、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）、及び炭素（架橋メチレンホスホネート）による置き換えによっても修飾され得る。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。

【0083】

リン酸基は、ある特定の骨格修飾において、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、スルホネート、スルホンアミド、チオホルムアセタール、ホルムアセタール、オキシム、メチレンイミノ、メチレンメチルイミノ、メチレンヒドラゾ（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。

【0084】

核酸を模倣し得る足場もまた構築することができ、リン酸リンカー及びリボース糖は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る。そのような修飾は、骨格及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。例には、限定するものではないが、モルホリノ、シクロブチル、ピロリジン、及びペプチド核酸（PNA）ヌクレオシド代替物が含まれ得る。

【0085】

修飾ヌクレオシド及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ため、核酸の安定性を増強し得る。

【0086】

2'ヒドロキシル基修飾の例には、アルコキシまたはアリアルオキシ（OR、式中、「R」は、アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、または糖であり得る）、ポリエチレングリコール（PEG）、O（CH₂CH₂O）_nCH₂CH₂ORが挙げられ得、式中、Rは、例えば、Hまたは任意に置換されたアルキルであり得、nは、0～20の整数であり得る（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、及び4～20）。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'-ヒドロキシル基を水素で置き換える2'-H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C₁₋₆アルキレンまたはC₁₋₆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）を含んでもよく、例示的な架橋としては、メチレン、プロピレン、エーテル、またはアミノ架橋、O-アミノ（アミノは、例えば、NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘテロシクリル、アリアルアミノ、ジアリアルアミノ、ヘテロアリアルアミノ、もしくはジヘテロアリアルアミノ、エチレンジアミン、もしくはポリアミノであり得る）、及びアミノアルコキシ、O（CH₂）_n-アミノ（アミノは、例えば、NH₂、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヘ

10

20

30

40

50

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において、2'ヒドロキシル基修飾は、メトキシエチル基(MOE)、($\text{OC}_2\text{H}_4\text{OCH}_3$ 、例えば、PEG誘導体)を含み得る。

【0087】

「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(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)、 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -アミノ(ここでアミノは、例えば、本明細書において記載されるようなものである)、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (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、アルキルチオールアルキル、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、アルケニル及びアルキニルを含み得、任意に、例えば、本明細書に記載されるようなアミノで置換されてもよい。

【0088】

糖修飾は、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1つ以上の炭素を含む糖基を含み得る。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。

【0089】

修飾核酸に組み込むことができる本明細書に記載される修飾ヌクレオシド及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)、及びウラシル(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が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、プリンアナログ、またはピリミジンアナログ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、及び塩基の合成誘導体を含み得る。

【0090】

デュアルガイドRNAを用いる実施形態では、crRNA及びtracrRNAの各々は、修飾を含み得る。このような修飾は、crRNA及び／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、化学修飾されてもよく、及び／または内部ヌクレオシドが修飾されてもよく、及び／またはsgRNA全体が化学修飾されてもよい。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。

【0091】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、2017年12月8日に出願された「Chemically Modified Guide RNAs」という発明の名称のWO2018/107028A1に開示された修飾パターンのうちの1つを含み、その内容は、参照によりそれら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、本明細書に開示されるガイドRNAは、US20170114334に開示された構造／修飾パターンのうちの1つを含み、その内容は、参照によりそれら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、本明細書に開示されるガイドRNAはWO2017/136794、WO2017004279、US2018187186、US2019048338に開示された構造／修飾パターンのうちの1つを含み、その内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態では、本開示の s g R N A は、以下の表 2 に示される修飾パターンを含む。表 2 の「完全配列」は、表 1 に列挙されるガイドの各々の s g R N A 配列を指す。「完全配列修飾」は、各 s g R N A の修飾パターンを示す。

【 0 0 9 3 】

【表 2】

表 2: sgRNA 及びヒトアルブミンガイド配列の sgRNA への修飾パターン

ガイド ID	完全配列	配列番号:	完全配列修飾	配列番号:
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUm AmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	66
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAUAUG UUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUm AmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	67
G009852	UGCAUUUGUUUCAAUAUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAUAUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUm GmCmU*mU*mU*mU	68
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCACGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	37	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm UmGmCmU*mU*mU*mU	69
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUGGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	70
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	39	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	71

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列 番号:	完全配列修飾	配列 番号:
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	40	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	72
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	73
G009866	UACUAAAACUUUUAUUUACUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUUUUAUUUACUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	74
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	75
G009868	AAUGCAUAAUCUAGUCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	44	mA*mA*mU*GCAUAAUCUAGUCAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	76
G009874	UAAUAAAAUCAAACAUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	45	mU*mA*mA*UAAAAUCAAACAUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	77
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	46	mG*mC*mA*UCUUUAAAGAAUUAUUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	78

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列番号:	完全配列修飾	配列番号:
G012748	UUUGGCAUUUUAUUUCUAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	47	mU*mU*mU*GGCAUUUUAUUUCUAAAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	79
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUUACAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	48	mU*mG*mU*AUUUUGUGAAGUCUUACAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	80
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	49	mU*mC*mC*UAGGUAAAAAAAAAAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	81
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	50	mU*mA*mA*UUUUCUUUUGCGCACUAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	82
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	51	mU*mG*mA*CUGAAACUUCACAGAAUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	83
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	52	mG*mA*mC*UGAAACUUCACAGAAUAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	84
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	53	mU*mU*mC*AUUUUAGUCUGUCUUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	85

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列 番号:	完全配列修飾	配列 番号:
G012755	AUUUAUCUAAGUUUGAAUAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	54	mA*mU*mU*AUCUAAGUUUGAAUAUAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	86
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	55	mA*mA*mU*UUUUAAAAUAGUAUUCUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	87
G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	56	mU*mG*mA*AUUAUUCUUCUGUUUAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	88
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	57	mA*mU*mC*AUCCUGAGUUUUUCUGUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	89
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUACGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	58	mU*mU*mA*CUAAAACUUUAUUUUACGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	90
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUACCGUUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	59	mA*mC*mC*UUUUUUUUUUUACCGUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	91
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	60	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUUGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	92

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列番号:	完全配列修飾	配列番号:
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	61	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAACUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	93
G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	62	mU*mG*mG*GCAAGGGAAGAAAAAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	94
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	63	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGCAAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	95
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCAGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	64	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGCAGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	96
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUCGUUUU AGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU	65	mU*mG*mA*GCAACCUCACUCUUGUCGU UUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	97

10

20

30

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態では、修飾 s g R N A は、以下の配列：m N * m N * m N * N N N N N N N N N N N N N N N G U U U U A G A m G m C m U m A m G m A m A m A m U m A m G m C A A G U U A A A A U A A G G C U A G U C C G U U A U C A m A m C m U m U m G m A m A m A m A m A m G m U m G m G m C m A m C m C m G m A m G m U m C m G m G m U m G m C m U * m U * m U * m U（配列番号 3 0 0）を含み、「N」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであってもよく、Nの全体は、表 1 に記載されるアルブミンイントロン 1 ガイド配列を含む。例えば、配列番号 3 0 0 が本明細書に包含され、N は、表 1 に本明細書で開示されるガイド配列（配列番号 2 ～ 3 3）のうちのいずれかで置き換えられる。

40

【 0 0 9 5 】

例えば、配列番号 3 0 0 が本明細書に包含され、N は、表 1 に本明細書で開示されるガイド配列（配列番号 2 ～ 5、1 0 ～ 1 7、2 1 ～ 2 7、及び 2 9 ～ 3 3）のうちのいずれかで置き換えられる。

【 0 0 9 6 】

50

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

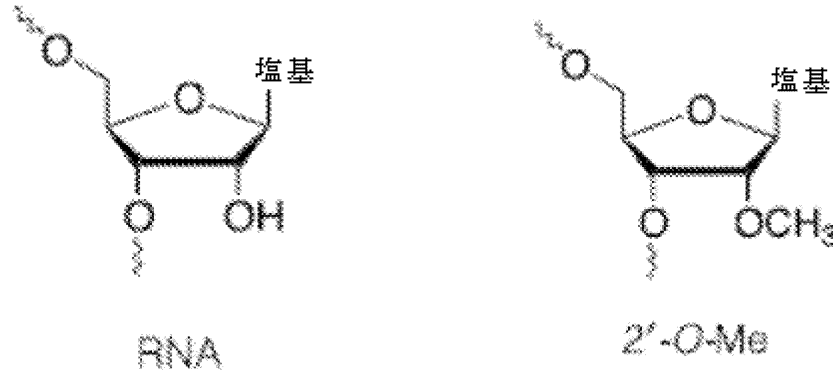
【0097】

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

【0098】

2'-O-メチルの修飾は、以下のように描写され得る。

【化1】



10

【0099】

ヌクレオチド糖環に影響する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及びヌクレアーゼ安定性を増加させることができる。

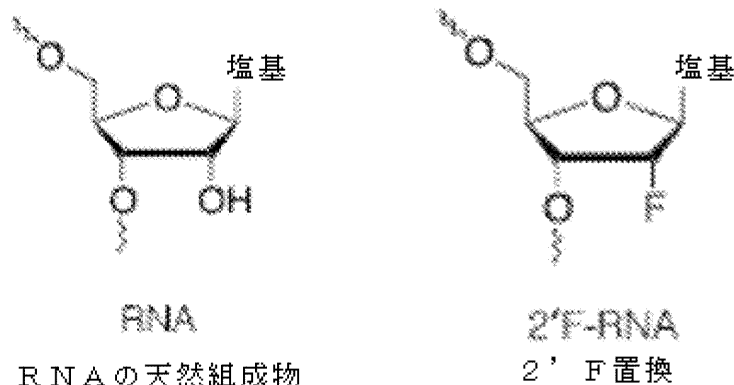
【0100】

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

【0101】

2'-Fの置換は、以下のように描写され得る。

【化2】



30

【0102】

ホスホロチオエート(P S)連結または結合は、硫黄が、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中の1つの非架橋リン酸酸素に置き換えられる結合を指す。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。

【0103】

P S修飾を示すために、「*」が使用され得る。本出願では、A*、C*、U*、またはG*という用語を使用して、P S結合で次の(例えば3')ヌクレオチドに連結されるヌクレオチドを示すことができる。

【0104】

40

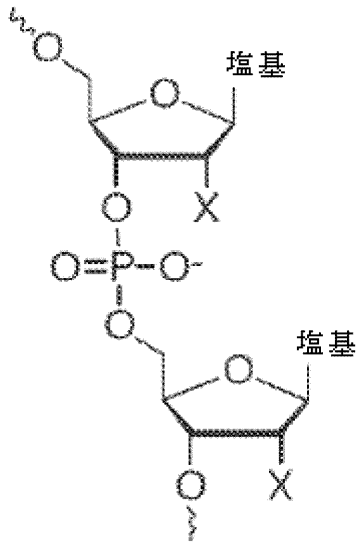
50

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

【0105】

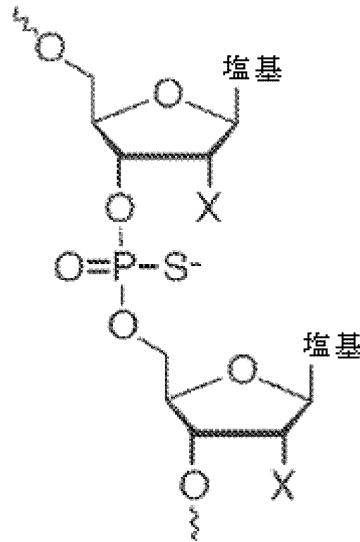
以下の図は、非架橋リン酸酸素へのS-の置換を示し、ホスホジエステル結合の代わりにPS結合を生じる。

【化3】



ホスホジエステル

RNAの天然
ホスホジエステル連結



ホスホロチオエート (PS)

修飾ホスホロチオエート
(PS) 結合

【0106】

脱塩基ヌクレオチドは、窒素系塩基を欠くものを指す。以下の図は、塩基を欠いている脱塩基（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。

10

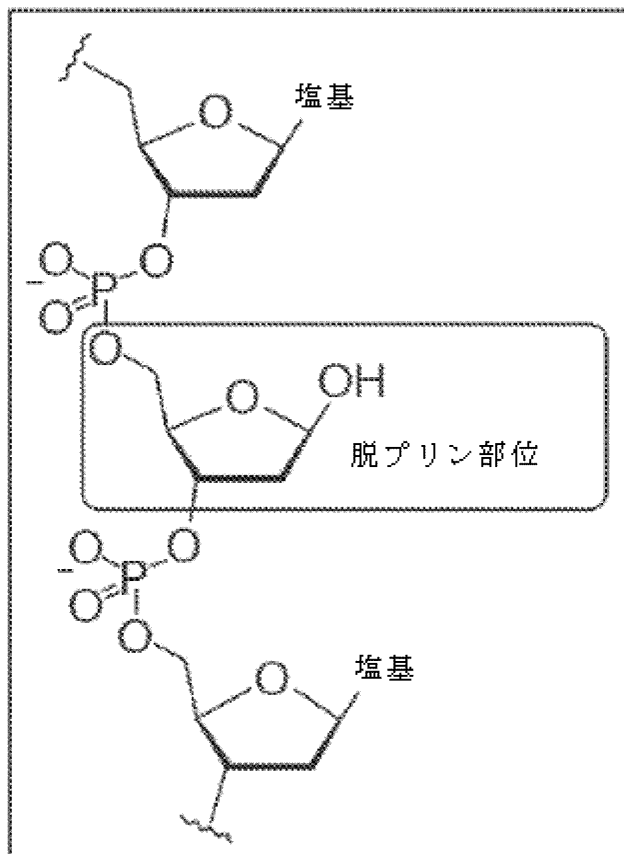
20

30

40

50

【化 4】



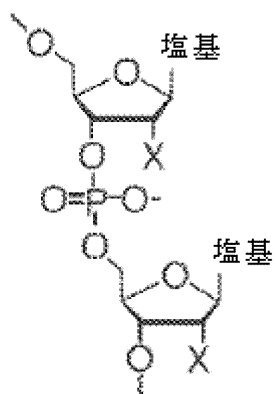
10

20

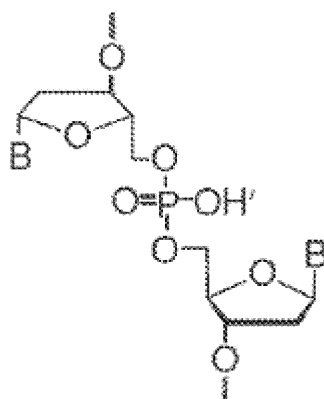
【 0 1 0 7】

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】



正常なオリゴヌクレオチド連結



反転したオリゴヌクレオチド連結

30

40

【 0 1 0 8】

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' への連結を介して末端部の 5' ヌクレオチドに接続してもよく、または脱塩基ヌクレオチドは、3' から 3' への連結を介して末端部の 3' ヌクレオチドに接続してもよい。末端部の 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。

【 0 1 0 9】

50

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、及び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、または安定性及び／または性能を増加させることが当該技術分野で既知の他のヌクレオチド修飾である。

【0110】

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、及び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。

【0111】

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、及び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、及び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、及び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。

【0112】

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、sgRNAは、配列番号300に示される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、ヒトアルブミンイントロン1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)を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34~97のうちのいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2~33のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号300のヌクレオチドとを含むsgRNAを含み、配列番号300のヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、sgRNAは、例えば、配列番号300に示されるように修飾され得る。

【0114】

いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号34~37、42~49、53~59、61~69、74~81、85~91、及び93~97のうちのいずれか1つに示されるsgRNAを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2~5、10~17、21~27、及び29~33のガイド配列のうちのいずれか1つと、配列番号300のヌクレオチドとを含むsgRNAを含み、配列番号300のヌクレオチドは、ガイド配列の3'末端にあり、sgRNAは、例えば、配列番号300に示されるように修飾され得る。

【0115】

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。以下に記載されるように、Casヌクレアーゼを含むmRNAは、Cas9ヌクレアーゼ、例えば、クリベース、ニッカーゼ、及び／または部位特異的DNA結合活性を有するSpyogenes Cas9ヌクレアーゼを含み得る。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。

【0116】

修飾Cas9 ORFを含むCas9 ORFは、本明細書において提供され、当該技術

10

20

30

40

50

分野で既知である。一例として、Cas9 ORFは、コード配列が1つ以上のアミノ酸の1つ以上の代替コドンを含むように、コドン最適化することができる。本明細書で使用する「代替コドン」は、所与のアミノ酸についてのコドン使用頻度の変形を指し、所与の発現系に好ましいまたは最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用頻度、または所与の発現系において良好に耐受されるコドンは、当該技術分野で既知である。WO2013/176772、WO2014/065596、WO2016/106121、及びWO2019/067910のCas9コード配列、Cas9 mRNA、及びCas9タンパク質配列は、参照により本明細書に組み込まれる。特に、WO2019/067910の段落[0449]の表のORF及びCas9アミノ酸配列、ならびにWO2019/067910の段落[0214]～[0234]のCas9 mRNA及びORFは、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0117】

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位で修飾されたシュドウリジンである。修飾ウリジンは、例えば、シュドウリジン、N1-メチルシュドウリジン、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、シュドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、N1-メチルシュドウリジンである。いくつかの実施形態では、修飾ウリジンは、シュドウリジン及びN1-メチルシュ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、シュドウリジン及び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-メチルシュドウリジン及び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-ヨードウリジン及びN1-メチルシュ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、シュドウリジン及び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-ヨードウリジン及び5-メトキシウリジンの組み合わせである。

20

30

【0118】

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、以下で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及び第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及び第2の転写ヌクレオチドのリボースは、それぞれ、2'-メトキシ及び2'-ヒドロキシルを含む。Cap2において、mRNAの第1及び第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を参照されたい。ヒトmRNAなどの哺乳動物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ならびにCap1及びCap2とは異なる他のキャップ構造は、IFIT-1及びIFIT-5など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、ヒトなど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及びIFIT-5など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e

40

50

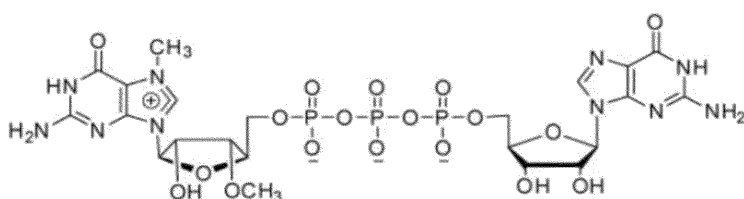
I F 4 Eと競合する場合があります、mRNAの翻訳を潜在的に阻害する。

【0119】

キャップは、共転写的に含めることができる。例えば、ARCA（抗逆キャップアナログ、Thermo Fisher Scientificカタログ番号AM8045）は、グアニ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アナログであり、開始時にインビトロで転写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を参照されたい。ARCAの構造を以下に示す。

10

【化6】



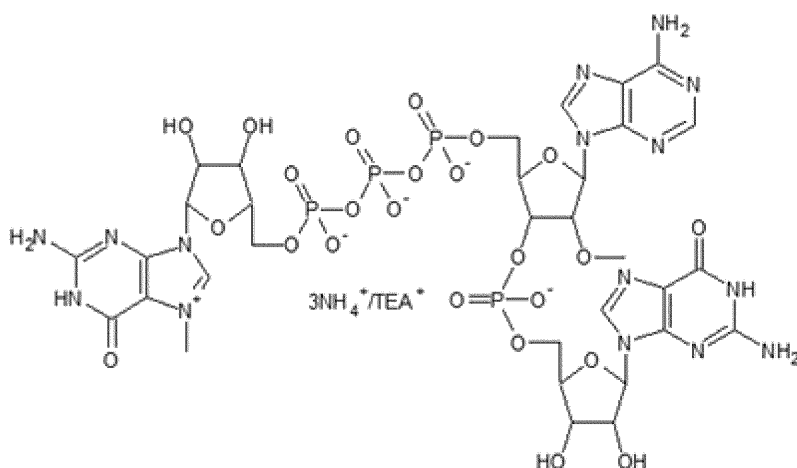
20

【0120】

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及びCleanCap（商標）GGの3'-O-メチル化状態様も、それぞれ、カタログ番号N-7413及びN-7433としてTriLink Biotechnologiesから利用可能である。CleanCap（商標）AGの構造を以下に示す。

30

【化7】



40

【0121】

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提供されるRNAトリホスファターゼ及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提供

50

されるグアニンメチルトランスフェラーゼとを有する。したがって、S-アデノシルメチオニン及び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を参照されたい。

【0122】

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、任意に、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。

【0123】

C. ドナー構築物

本明細書に記載の組成物及び方法は、本開示のガイドRNA及びRNAガイドDNA結合剤によって作成される切断部位に挿入される異種第IX因子遺伝子をコードする配列を含む核酸構築物の使用を含む。本明細書で使用される場合、そのような構築物は、時に、「ドナー構築物／テンプレート」と称される。いくつかの実施形態では、構築物は、DNA構築物である。ドナー構築物に対する様々な機能的／構造的修飾を設計及び作製する方法は、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、構築物は、ポリアデニル化テール配列、ポリアデニル化シグナル配列、スプライスアクセプター部位、または選択マーカのうちのいずれか1つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化テール配列は、コード配列の3'末端で、例えば、「ポリ-A」ストレッチとしてコードされる。好適なポリアデニル化テール配列及び／またはポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、UAUAAA（配列番号801）またはAU/GUAAA（配列番号802）などのバリエーションが同定されているが、ポリアデニル化シグナル配列AAUAAA（配列番号800）は、哺乳動物系で一般的に使用される。例えば、NJ Proudfoot, Genes & Dev. 25 (17): 1770-82, 2011を参照されたい。

【0124】

いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含み、第IX因子配列は、野生型第IX因子、例えば、配列番号700である。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含み、第IX因子配列は、野生型第IX因子、例えば、配列番号701である。いくつかの実施形態では、配列は、第IX因子のバリエーションをコードする。例えば、バリエーションは、野生型第IX因子よりも増加した凝固活性を有し得る。例えば、バリエーション第IX因子は、配列番号701に対してR338位（例えばR338L）にアミノ酸置換などの1つ以上の変異を含み得る。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号700、配列番号701、または配列番号702と80%、85%、90%、93%、95%、97%、99%同一であり、野生型第IX因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有する第IX因子バリエーションをコードする。いくつかの実施形態では、配列は、第IX因子の断片をコードし、断片は、野生型第IX因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有する。

【0125】

いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子バリエーションをコードする配列を含み、第IX因子バリエーションは、その補因子である第VIII因子の不在下で凝固を活性化することができる。そのような第IX因子バリエーションは、野生型第IX因子の活性をさらに維持することができる。そのような第IX因子バリエーションは、血友病Bなどの血友病を治療するために使用され得る。例えば、そのような第IX因子バリエーションは、野生型第IX因子に対

して（例えば、配列番号 701 に対して）L 6 位、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、I 3 8 3 位、E 1 8 5 位、またはそれらの組み合わせにアミノ酸置換を含み得る。例えば、そのような第 I X 因子バリエーションは、野生型第 I X 因子に対して（例えば、配列番号 701 に対して）L 6 F 変異、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、I 3 8 3 V 変異、E 1 8 5 D 変異、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【0126】

一例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位及び V 1 8 1 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位及び K 2 6 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位及び K 2 6 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、K 2 6 5 位及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、K 2 6 5 位及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、I 3 8 3 位及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、及び K 2 6 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、K 2 6 5 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、K 2 6 5 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、K 2 6 5 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、K 2 6 5 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。

【0127】

特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。別の特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、I 3 8 3 位、及び E 1 8 5 位にアミノ酸置換を含み得る。別の特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 位、V 1 8 1 位、K 2 6 5 位、及び I 3 8 3 位にアミノ酸置換を含み得る。

【0128】

一例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 F 変異及び V 1 8 1 I 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 F 変異及び K 2 6 5 A 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 F 変異及び I 3 8 3 V 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 F 変異及び E 1 8 5 D 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異及び K 2 6 5 A 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異及び I 3 8 3 V 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異及び E 1 8 5 D 変異を含み得る。別の例では、第 I X 因子タンパク質は、K 2 6 5 A 変異及び I 3 8 3 V 変異を含み得る。別の例では、第 I

X因子タンパク質は、K 2 6 5 A変異及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、I 3 8 3 V変異及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、及びK 2 6 5 A変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、K 2 6 5 A変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、K 2 6 5 A変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 6 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 6 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、K 2 6 5 A変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、K 2 6 5 A変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。別の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。

【0129】

特定の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。別の特定の例では、第I X因子タンパク質は、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、I 3 8 3 V変異、及びE 1 8 5 D変異を含み得る。いくつかの実施形態では、第I X因子バリエーションは、配列番号700と少なくとも80%、85%、90%、93%、95%、97%、99%同一であり、野生型第I X因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有する。ある特定の実施形態では、第I X因子バリエーションは、配列番号700と80%、85%、90%、93%、95%、97%、99%同一であり、野生型第I X因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有し、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、I 3 8 3 V変異、及び／またはE 1 8 5 D変異を含む。別の特定の例では、第I X因子タンパク質は、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及びI 3 8 3 V変異を含み得る。いくつかの実施形態では、第I X因子バリエーションは、配列番号700と少なくとも80%、85%、90%、93%、95%、97%、99%同一であり、野生型第I X因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有し、L 6 F変異、V 1 8 1 I変異、K 2 6 5 A変異、及び／またはI 3 8 3 V変異を含む。

【0130】

構築物の長さは、挿入される遺伝子のサイズに応じて変化することができ、例えば、200塩基対(bp)～約5000bp、例えば、約200bp～約2000bpなど、約500bp～約1500bpなどであり得る。いくつかの実施形態では、DNAドナーテンプレートの長さは、約200bpであるか、または約500bpであるか、または約800bpであるか、または約1000塩基対であるか、または約1500塩基対である。他の実施形態では、ドナーテンプレートの長さは、少なくとも200bpであるか、または少なくとも500bpであるか、または少なくとも800bpであるか、または少なくとも1000bpであるか、または少なくとも1500bpである。他の実施形態では、ドナーテンプレートの長さは、少なくとも200bpであるか、または少なくとも500bpであるか、または少なくとも800bpであるか、または少なくとも1000bpであるか、または少なくとも1500bp、または少なくとも2000、または少なくとも

2500、または少なくとも3000、または少なくとも3500、または少なくとも4000、または少なくとも4500、または少なくとも5000である。

【0131】

構築物は、DNAもしくはRNA、一本鎖、二本鎖、または部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得、直鎖または環状（例えば、ミニサークル）形態で宿主細胞に導入され得る。例えば、米国特許公開第2010/0047805号、同第2011/0281361号、同第2011/0207221号を参照されたい。直鎖形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に既知の方法によって（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基は、直鎖分子の3'末端に添加され、及び／または自己相補性オリゴヌクレオチドは、一方または両方の末端にライゲーションされる。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963、Nehls et al. (1996) Science 272:886-889を参照されたい。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護するための追加の方法は、限定されないが、末端アミノ基（複数可）の添加、ならびに例えば、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、及びO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用を含む。構築物は、例えば、複製起源、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞内に導入され得る。構築物は、ウイルス要素を取り除き得る。さらに、ドナー構築物は、裸の核酸として、リポソームもしくはポロキサマーなどの薬剤と複合体化した核酸として導入され得るか、またはウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【0132】

いくつかの実施形態では、構築物は、その発現が挿入部位における内因性プロモーター（例えば、ドナーが宿主細胞のアルブミン遺伝子座に組み込まれるときの内因性アルブミンプロモーター）によって促進されるように挿入され得る。そのような場合、導入遺伝子は、その発現を促進する制御エレメント（例えば、プロモーター及び／またはエンハンサー）を欠いてもよい（例えば、プロモーターレス構築物）。それにもかかわらず、他の場合において、構築物は、プロモーター及び／またはエンハンサー、例えば、組み込み時に機能性タンパク質の発現を促進する構成的プロモーター、または誘導性もしくは組織特異的（例えば、肝臓または血小板特異的）プロモーターを含み得ることが明らかであろう。構築物は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列の下流にある異種第IX因子タンパク質をコードする配列を含み得、シグナルペプチドをコードするシグナル配列に作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、第IX因子タンパク質をコードする核酸の相同性非依存挿入において作用する。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、非分裂細胞、例えば、HRではなくNHEJが、二本鎖DNA切断が修復される一次機序である細胞において作用する。核酸は、相同性非依存性ドナー構築物であり得る。

【0133】

異種第IX因子核酸（第IX因子導入遺伝子）を含むいくつかのドナー構築物は、非相同末端結合によって、遺伝子編集系の標的DNA配列の切断部位に挿入することができる（例えば、アルブミン遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子に挿入することができる）。いくつかの場合では、そのような構築物は、相同性アームを含まない。例えば、そのような構築物は、本明細書に開示される遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas系）による切断後に平滑末端二本鎖切断に挿入され得る。特定の例では、構築物は、AAVを介して送達され得、非相同末端結合による挿入が可能であり得る（例えば、構築物は、相同性アームを含まないものであり得る）。

【0134】

特定の例では、構築物は、相同性非依存性標的組み込みを介して挿入され得る。例えば、構築物中の異種第IX因子核酸は、遺伝子編集系の標的部位（例えば、標的挿入のための標的DNA配列と同じ標的部位（例えば、セーフハーバー遺伝子内）、及び標的挿入の

ための標的DNA配列を切断するために使用されている同じ遺伝子編集系）によって、各側に隣接し得る。次いで、遺伝子編集系は、異種第IX因子核酸に隣接する標的部位を切断することができる。特定の例では、構築物は、AAV媒介性送達で送達され、異種第IX因子核酸に隣接する標的部位の切断は、AAVの逆位末端反復（ITR）を除去することができる。いくつかの方法では、異種第IX因子核酸が正しい配向で切断部位または標的DNA配列に挿入される場合、標的挿入のための標的DNA配列（例えば、セーフハーバー遺伝子座内の標的DNA配列、例えば、隣接プロトスペーサー隣接モチーフを含むgRNA標的配列）は、もはや存在しないが、異種第IX因子核酸が逆の配向で切断部位または標的DNA配列に挿入される場合、それは再編成される。これは、異種第IX因子核酸が発現のために正しい配向で挿入されることを確実にするのに役立ち得る。

10

【0135】

第IX因子遺伝子の増強された挿入及び発現を可能にする双方向性核酸構築物も本明細書に記載される。簡潔には、本明細書に開示される様々な双方向性構築物は、少なくとも2つの核酸セグメントを含み、一方のセグメント（第1のセグメント）は、第IX因子（本明細書において、時に「導入遺伝子」と互換的に称される）をコードするコード配列を含むが、他方のセグメント（第2のセグメント）は、配列の相補体が第IX因子をコードする配列を含む。

【0136】

一実施形態では、双方向性構築物は、cisに少なくとも2つの核酸セグメントを含み、一方のセグメント（第1のセグメント）は、コード配列（本明細書において、時に「導入遺伝子」と互換的に称される）を含むが、他方のセグメント（第2のセグメント）は、配列の相補体が導入遺伝子をコードする配列を含む。第1の導入遺伝子及び第2の導入遺伝子は、同一であっても異なってもよい。双方向性構築物は、cisに少なくとも2つの核酸セグメントを含み得、一方のセグメント（第1のセグメント）は、一方の配向で異種遺伝子をコードするコード配列を含むが、他方のセグメント（第2のセグメント）は、相補体が他方の配向で異種遺伝子をコードする配列を含む。すなわち、第1のセグメントは、第2のセグメントの相補体であり（必ずしも完全な相補体ではない）、第2のセグメントの相補体は、第1のセグメントの逆相補体である（両方とも同じ異種タンパク質をコードするが、必ずしも完全な逆相補体ではない）。双方向性構築物は、スプライスアクセプターに連結した異種遺伝子をコードする第1のコード配列と、相補体が他方の配向で異種遺伝子をコードし、スプライスアクセプターにも連結した2のコード配列とを含み得る。

20

30

【0137】

本明細書に記載の遺伝子編集系（例えば、CRISPR/Cas系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）系）と組み合わせて使用した場合、核酸構築物の双方向性は、構築物を標的挿入部位内のいずれかの方向（1つの方向への挿入に限定されない）で挿入することを可能にし、本明細書に例示されるように、a）1つのセグメントのコード配列（例えば、図1の左上のssAAV構築物の「ヒトF9」をコードする左側セグメント）、またはb）他のセグメントの相補体（例えば、図1の左上のssAAV構築物において逆さまに示される「ヒトF9」をコードする右側セグメントの相補体）のいずれかから第IX因子の発現を可能にし、それによって、挿入及び発現効率を向上させる。例えば、CRISPR/Cas系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）系を含む、様々な既知の遺伝子編集系が本開示の実施において使用され得る。

40

【0138】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用に必要な、及び／または1つ以上の所望の機能を付与する任意の好適な構造特徴を含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される双方向性核酸構築物は、相同性アームを含まない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される双方向性核酸構築物は、相同性非依存性ドナー構築物である。いくつかの実施形態では、部分的には、核酸構築物の双方向性機能に起因して、双方向性構築物は、目的のポリペプチド（例えば、第IX因子）の効率

50

的な挿入及び／または発現を可能にするために、本明細書に記載のいずれかの方向でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【0139】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、第ⅠX因子の発現を促進するプロモーターを含まない。例えば、第ⅠX因子の発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のアルブミン遺伝子座に組み込まれるときの内因性アルブミンプロモーター）によって促進される。

【0140】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、第ⅠX因子のコード配列を含む第1のセグメント、及び第ⅠX因子のコード配列の逆相補体を含む第2のセグメントを含む。したがって、第1のセグメントにおけるコード配列は、第ⅠX因子を発現することができるが、一方で、第2のセグメントにおける逆相補体の相補体もまた、第ⅠX因子を発現することができる。本明細書で使用される場合、逆相補配列を含む第2のセグメントを指す場合、「コード配列」は、第2のセグメントの相補的（コード）鎖（すなわち、第2のセグメントにおける逆相補配列の相補的コード配列）を指す。

【0141】

いくつかの実施形態では、第1のセグメントにおける第ⅠX因子をコードするコード配列は、同じく第ⅠX因子をコードするコード配列の逆相補体に対して100%未満相補的である。すなわち、いくつかの実施形態では、第1のセグメントは、第ⅠX因子のコード配列（1）を含み、第2のセグメントは、第ⅠX因子のコード配列（2）の逆相補体であり、コード配列（1）は、コード配列（2）と同一ではない。例えば、第ⅠX因子をコードするコード配列（1）及び／またはコード配列（2）は、コード配列（1）及びコード配列（2）の逆相補体が100%未満の相補性を有するように、コドン最適化され得る。いくつかの実施形態では、第2のセグメントのコード配列は、第1のセグメントにおけるコード配列によってコードされる同じ（すなわち、同じアミノ酸配列）第ⅠX因子の1つ以上のアミノ酸のための1つ以上の代替コドンを使用して、第ⅠX因子をコードする。本明細書で使用される「代替コドン」は、所与のアミノ酸についてのコドン使用頻度の変形を指し、所与の発現系に好ましいまたは最適化されたコドン（コドン最適化）であってもなくてもよい。好ましいコドン使用頻度、または所与の発現系において良好に耐容されるコドンは、当該技術分野で既知である。

【0142】

いくつかの実施形態では、第2のセグメントは、ヘアピン形成を低減するために、第1のセグメントのコード配列とは異なるコドン使用頻度を採用する逆相補配列を含む。そのような逆相補体は、第1のセグメントにおけるコード配列の全てのヌクレオチドよりも少ない塩基対を形成するが、依然として、任意に同じポリペプチドをコードする。そのような場合では、例えば、ポリペプチドAの、第1のセグメントのコード配列は、例えば、ポリペプチドAの、双方向性構築物の後半のコード配列と相同であり得るが、同一ではない。いくつかの実施形態では、第2のセグメントは、第1のセグメントにおけるコード配列に対して実質的に相補的ではない（例えば、70%以下相補的である）逆相補配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のセグメントは、第1のセグメントにおけるコード配列に対して高度に相補的（例えば、少なくとも90%相補的）である逆相補配列を含む。いくつかの実施形態では、第2のセグメントは、第1のセグメントにおけるコード配列に対して少なくとも約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、または約99%相補性を有する逆相補配列を含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、第2のセグメントは、第1のセグメントにおけるコード配列に対して100%相補性を有する逆相補配列を含む。すなわち、第2のセグメント内の配列は、第1のセグメントにおけるコード配列の完全な逆相補体である。例として、第1のセグメントは、仮定配列5'CTGGACCGA3'（配列番号500）を含み、第2のセ

10

20

30

40

50

グメントは、配列番号 1 の逆相補体、すなわち、5' T C G G T C C A G 3'（配列番号 502）を含む。

【0144】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、第 I X 因子（第 1 のポリペプチド）のコード配列を含む第 1 のセグメント、及び（第 2 の）ポリペプチドのコード配列の逆相補体を含む第 2 のセグメントを含む。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 のセグメントは、各々上記のように、同じポリペプチド（例えば、第 I X 因子）をコードするコード配列を含む。いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 のセグメントは、各々、異なるポリペプチドをコードするコード配列を含む。例えば、第 1 のポリペプチドは、第 I X 因子であり、第 2 のポリペプチドは、ポリペプチド B である。さらなる例として、第 1 のポリペプチドは、第 I X 因子であり、第 2 のポリペプチドは、第 I X 因子のバリエーション（例えば、断片、変異体、融合体）（例えば、本明細書に記載の R 338 L 変異を有する）である。ポリペプチドをコードするコード配列は、任意に、ポリペプチドに連結されたシグナル配列、標識配列（例えば、H i B i t）、または異種機能配列（例えば、核局在化配列（N L S）または自己切断ペプチド）などのアミノ末端またはカルボキシ末端アミノ酸配列をコードする配列など 1 つ以上の追加の配列を含み得る。ポリペプチドをコードするコード配列は、任意に、1 つ以上のアミノ末端シグナルペプチド配列をコードする配列を含み得る。これらの追加の配列の各々は、構築物の第 1 のセグメント及び第 2 のセグメントにおいて同じまたは異なってもよい。

【0145】

いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、直鎖状である。例えば、第 1 及び第 2 のセグメントは、リンカー配列を通して直鎖様式で結合される。いくつかの実施形態では、逆相補配列を含む第 2 のセグメントの 5' 末端は、第 1 のセグメントの 3' 末端に連結される。いくつかの実施形態では、第 1 のセグメントの 5' 末端は、逆相補配列を含む第 2 のセグメントの 3' 末端に連結される。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、500、1000、1500、2000 以上のヌクレオチド長である。当業者によって理解されるように、リンカー配列に加えて、またはリンカー配列の代わりに他の構造要素が、第 1 のセグメントと第 2 のセグメントとの間に挿入され得る。

【0146】

本明細書に開示される双方向性構築物は、任意の特定の使用に必要な、及び／または 1 つ以上の所望の機能を付与する任意の好適な構造特徴を含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される双方向性核酸構築物は、相同性アームを含まない。いくつかの実施形態では、部分的には、核酸構築物の双方向性機能に起因して、双方向性構築物は、目的のポリペプチド（例えば、異種第 I X 因子）の効率的な挿入及び／または発現を可能にするために、本明細書に記載のいずれかの方向（配向）でゲノム遺伝子座に挿入され得る。

【0147】

いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 のセグメントの一方または両方は、ポリアデニル化テール配列を含む。好適なポリアデニル化テール配列を設計する方法は、当該技術分野で周知である。

【0148】

いくつかの実施形態では、第 1 及び第 2 のセグメントの一方または両方は、オープンリーディングフレームの下流にポリアデニル化テール配列及び／またはポリアデニル化シグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化テール配列は、第 1 及び／または第 2 のセグメントの 3' 末端で、例えば、「ポリ-A」ストレッチとしてコードされる。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化テール配列は、第 1 及び／または第 2 のセグメントの 3' 末端で、またはその近傍においてコードされるポリアデニル化シグナル配列の

結果として共転写的に提供される。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、任意に、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。好適なポリアデニル化テール配列及び／またはポリアデニル化シグナル配列を設計する方法は、当該技術分野で周知である。マウスアルブミン及びヒトFIXスプライスアクセプター部位を含む、好適なスプライスアクセプター配列が本明細書に開示され、例示される。いくつかの実施形態では、UAUAAA（配列番号801）またはAU/GUAAA（配列番号802）などのバリエーションが同定されているが、ポリアデニル化シグナル配列AAUAAA（配列番号800）は、哺乳動物系で一般的に使用される。例えば、NJ Proudfoot, Genes & Dev. 25 (17): 1770-82, 2011を参照されたい。いくつかの実施形態では、ポリAテール配列が含まれる。

10

【0149】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、DNAもしくはRNA、一本鎖、二本鎖、または部分的に一本鎖及び部分的に二本鎖であり得る。例えば、構築物は、一本鎖または二本鎖DNAであり得る。いくつかの実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるように（例えばヌクレオシドアナログを使用して）修飾され得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、構築物のいずれかまたは両方の末端、例えば、第1及び／または第2のセグメントにおけるオープンリーディングフレームの5'、または一方もしくは両方の導入遺伝子配列の5'上にスプライスアクセプター部位を含む。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター部位は、NAGを含む。さらなる実施形態では、スプライスアクセプター部位は、NAGからなる。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、アルブミンスプライスアクセプター、例えば、アルブミンのエクソン1及び2の一緒のスプライシングで使用されるアルブミンスプライスアクセプターである。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、ヒトアルブミン遺伝子由来である。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、マウスアルブミン遺伝子由来である。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、F9（または「FIX」）スプライスアクセプターであり、例えば、F9のエクソン1及び2の一緒のスプライシングで使用されるF9スプライスアクセプターである。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、ヒトF9遺伝子由来である。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプターは、マウスF9遺伝子由来である。人工スプライスアクセプターを含む、真核生物において有用な追加の好適なスプライスアクセプター部位が既知であり、当該技術分野に由来し得る。例えば、Shapiro, et al., 1987, Nucleic Acids Res., 15, 7155-7174、Burset, et al., 2001, Nucleic Acids Res., 29, 255-259を参照されたい。

20

30

【0151】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される双方向性構築物は、必要に応じて1つ以上の好適な構造特徴を含むように、及び／または1つ以上の機能的利益を付与するように、いずれかまたは両方の末端で修飾され得る。例えば、構造修飾は、本明細書に開示される構築物を宿主細胞に送達するのに使用される方法（複数可）、例えば、ウイルスベクター送達の使用または送達のための脂質ナノ粒子へのパッケージングに応じて変化し得る。そのような修飾は、限定するものではないが、例えば、逆位末端反復（ITR）、ヘアピン、ループ、及びトロイドなどの他の構造などの末端構造を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、1、2、または3つのITRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、2つ以下のITRを含む。構造修飾の様々な方法は、当該技術分野で既知である。

40

【0152】

いくつかの実施形態では、構築物の一方または両方の末端は、当該技術分野で既知の方

50

法によって（例えば、エキソ核酸分解から）保護され得る。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基は、直鎖分子の3'末端に添加され、及び／または自己相補性オリゴヌクレオチドは、一方または両方の末端にライゲーションされている。例えば、Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963、Nehls et al. (1996) Science 272:886-889を参照されたい。構築物を分解から保護するための追加の方法は、限定されないが、末端アミノ基（複数可）の添加、ならびに例えば、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、及びO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間連結の使用を含む。

【0153】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される構築物は、例えば、複製起源、プロモーター、及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクターの一部として細胞内に導入され得る。いくつかの実施形態では、構築物は、裸の核酸として、リポソーム、ポリマー、もしくはポロキサマーなどの薬剤と複合体化した核酸として導入され得るか、またはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス）によって送達され得る。

【0154】

いくつかの実施形態では、発現には必要ではないが、本明細書に開示される構築物はまた、転写または翻訳制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、インシュレーター、内部リボソーム侵入部位、ペプチドをコードする配列、及び／またはポリアデニル化シグナルを含み得る。

【0155】

いくつかの実施形態では、第IX因子のコード配列を含む構築物は、以下の修飾：コドン最適化（例えば、ヒトコドンへ）及び／または1つ以上のグリコシル化部位の追加のうちの1つ以上を含み得る。例えば、McIntosh et al. (2013) Blood (17):3335-44を参照されたい。

【0156】

D. 遺伝子編集系

例えば、CRISPR/Cas系、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）系、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）系を含む、様々な既知の遺伝子編集系が、本開示の実施において第IX因子の標的挿入に使用され得る。一般に、遺伝子編集系は、標的DNA配列において二本鎖切断（DSB）またはニック（例えば、一本鎖切断すなわちSSB）を誘導するために操作された切断系の使用を伴う。切断またはニックングは、操作されたZFN、TALENなど特異的ヌクレアーゼの使用を通じて、または操作されたガイドRNAを有するCRISPR/Cas系を使用して、標的DNA配列の特異的切断またはニックングを誘導することによって生じ得る。さらに、標的ヌクレアーゼは、ゲノム編集及び遺伝子療法における使用の可能性も有し得る、Argonaute系（例えば、「TtAgo」として知られるT. thermophilusから、Swartz et al (2014) Nature 507 (7491):258-261を参照されたい）に基づいて開発されている。

【0157】

本明細書に開示されるガイドRNAを使用する方法に関して、方法は、CRISPR/Cas系（及び第IX因子をコードする配列を含む本明細書に開示されるドナー構築物のうちのいずれか）の使用を含むことが理解されよう。また、本開示は、本明細書に開示されるガイドRNAありまたはなしで行われ得る（例えば、ZFN系を使用して標的DNA配列の切断を引き起こし、双方向性構築物の挿入のための部位を作成する）、本明細書に開示される双方向性構築物を使用した第IX因子の標的挿入及び発現の方法を企図することが理解されよう。

【0158】

いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas系（例えば、ガイドRNA及びRNA

10

20

30

40

50

ガイドDNA結合剤)を使用して、宿主ゲノム内の所望の遺伝子座に挿入部位を作成することができ、その部位で、本明細書に開示される第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物(例えば、双方向性構築物)を挿入して、第IX因子を発現することができる。第IX因子は、本明細書に記載されるように、その挿入部位または遺伝子座、例えば、第IX因子が通常発現されないセーフハーバー遺伝子座に関して異種であり得る。あるいは、いくつかの実施形態では、第IX因子は、その挿入部位、例えば、欠損第IX因子遺伝子を補正するために野生型第IX因子を内因性遺伝子座に挿入することに関して非異種であり得る。セーフハーバーは、ヒトアルブミン遺伝子などのアルブミン遺伝子内にあり得る。セーフハーバーは、アルブミンイントロン1領域、例えば、ヒトアルブミンイントロン1内にあり得る。セーフハーバーは、例えば、肝組織または肝細胞宿主細胞のヒトセーフハーバーであり得る。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を、RNAガイドDNA結合剤(例えば、Casヌクレアーゼ)と共に本方法に従って使用して、挿入部位を作製することができ、その部位で、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物(例えば、双方向性構築物)を挿入して、第IX因子を発現することができる。ヒトアルブミン遺伝子座のイントロン1への第IX因子の標的挿入に有用なガイドRNAが例示され、本明細書に記載される(例えば、表1を参照されたい)。

【0159】

様々なRNAガイドDNA結合剤、例えば、Casヌクレアーゼ、例えば、Cas9などのヌクレアーゼの使用法もまた、当該技術分野で周知である。CRISPR/Cas系を有する双方向性核酸の使用が本明細書に例示されるが、系に対する好適な変形も使用され得ることが理解されるであろう。文脈に応じて、RNAガイドDNA結合剤は、核酸(例えば、DNAまたはmRNA)としてまたはタンパク質として提供され得ることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、本方法は、RNAガイドDNA結合剤を既

【0160】

いくつかの実施形態では、Cas9ヌクレアーゼなどのRNAガイドDNA結合剤は、クリベース活性を有し、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、Cas9ヌクレアーゼなどのRNAガイドDNA結合剤は、ニッカーゼ活性を有し、これは一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。Casヌクレアーゼの例としては、*S. pyogenes*、*S. aureus*、及び他の原核生物のII型CRISPR系のもの(例えば、次の段落のリストを参照されたい)、ならびにそれらのバリエーションが挙げられる。例えば、US2016/0312198A1、US2016/0312199A1を参照されたい。

【0161】

Casヌクレアーゼの由来となり得る非限定的な例示的な種としては、*Streptococcus pyogenes*、*Streptococcus thermophilus*、*Streptococcus sp.*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria innocua*、*Lactobacillus gasseri*、*Francisella novicida*、*Wolinella succinogenes*、*Sutterella wadsworthensis*、*Gammaproteobacterium*、*Neisseria meningitidis*、*Campylobacter jejuni*、*Pasteurella multocida*、*Fibrobacter succinogenes*、*Rhodospirillum rubrum*、*Nocardiaopsis dassonvillei*、*Streptomyces pristinaespiralis*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptomyces viridochromogenes*、*Streptosporangium roseum*、*Streptosporangium roseum*、*Alicyclobacillus acidocaldarius*、Ba

cillus pseudomycoides, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales* 細菌, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas* sp., *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus* sp., *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becsicii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finnegoldia magna*, *Natronaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter* sp., *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Ostoc* sp., *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira* sp., *Lyngbya* sp., *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria* sp., *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus* sp., *Lachnospiraceae* 細菌 ND2006、及び *Acaryochloris marina* が挙げられる。

【0162】

いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9ヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、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* 細菌 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* 細菌、*Butyrivibrio proteoclasticus*、*Peregrinibacteria* 細菌、*Parcubacteria* 細菌、*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。ある特定の実施形態では、Casヌクレアーゼは、*Acidaminococcus*

usまたはLachnospiraceae由来のCpf1ヌクレアーゼである。

【0163】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤と合わせた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ヌクレアーゼと合わせた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と合わせたgRNAは、Cas9 RNPと呼ばれる。

【0164】

野生型Cas9は、2つのヌクレアーゼドメイン：RuvC及び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つを超えるRuvCドメイン及び／または1つを超える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、及び方法の実施形態の各々では、Casは、標的DNAにおける二本鎖切断を誘導する。

【0165】

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、FokI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。

【0166】

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。

【0167】

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、上で考察されたCasヌクレアーゼ)の一態様である。例えば、Casニッカーゼ及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号を参照されたい。いくつかの実施形態では、Cas9ニッカーゼなどのCasニッカーゼは、不活性化されたRuvCまたはHNHドメインを有する。

【0168】

いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤は、1つの機能的ヌクレアーゼドメインのみを含むように修飾される。例えば、薬剤タンパク質は、核酸切断活性を低下させるために、ヌクレアーゼドメインの1つが突然変異されるか、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、活性が低下した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、活性が低下した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。

10

20

30

40

50

【0169】

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、または変化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を参照されたい。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、及びD986A (S. pyogenesのCas9タンパク質に基づく) が挙げられる。例えば、Zetsche et al. (2015)を参照されたい。さらなる例示的なアミノ酸置換としては、D917A、E1006A、及びD1255A (Francisella novicida U112 Cpf1 (FnCpf1) 配列 (UniProtKB-A0Q7Q2 (CPF1_FRNATN) に基づく) が挙げられる。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、ニッカーゼは、それぞれ、標的配列のセンス鎖及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、二重ニックング）、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、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と共に使用され、標的DNA内に二重ニックを産生する。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と共に使用され、標的DNA内に二重ニックを産生する。

20

【0171】

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）。

【0172】

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（複数可）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（複数可）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末端部に連結する。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、単節型配列、例えば、SV40 NLS、PKKKRKV（配列番号600）またはPKKKRRV（配列番号601）であってもよい。いくつかの実施形態では、NLSは、双節型配列、例えば、ヌクレオプラスミンのNLSであるKRPAATKKAGQAKKKK（配列番号6

30

40

50

02)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、任意に、融合部位に含まれる。

【0173】

III. 送達方法

本明細書に開示されるガイドRNA、RNAガイドDNA結合剤(例えば、Casヌクレアーゼ)、及び核酸構築物(例えば、双方向性構築物)は、当該技術分野で利用可能な様々な既知の好適な方法を使用して、宿主細胞もしくは宿主細胞集団または対象に、インビボまたはエクスピボで送達され得る。ガイドRNA、RNAガイドDNA結合剤、及び核酸構築物は、適切な場合に同じまたは異なる送達方法を使用して、個別にまたは任意の組み合わせで一緒に送達することができる。

10

【0174】

従来のウイルス及び非ウイルスベースの遺伝子送達方法を使用して、本明細書に開示されるガイドRNA、ならびに細胞(例えば、哺乳動物細胞)及び標的組織内にRNAガイドDNA結合剤及びドナー構築物を導入することができる。本明細書でさらに提供されるように、非ウイルスベクター、プラスミドベクターなどの非ウイルスベクター送達系核酸、ならびに例えば、裸の核酸、及びリポソーム、脂質ナノ粒子(LNP)、またはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合体化した核酸。ウイルスベクター送達系には、DNA及びRNAウイルスが含まれる。

【0175】

核酸の非ウイルス送達のための方法及び組成物には、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション、バイオリスティック、ウイルソソーム、リポソーム、免疫リポソーム、LNP、ポリカチオンまたは脂質：核酸複合体、裸の核酸(例えば、裸のDNA/RNA)、人工ビリオン、及びDNAの薬剤強化取り込みが含まれる。例えば、Sonitron 2000系(Rich-Mar)を使用するソノポレーションもまた、核酸の送達に使用され得る。

20

【0176】

さらなる例示的な核酸送達系としては、Amaxa Biosystems(Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc.(Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston, Ma.)、及びCopernicus Therapeutics Inc.(例えば、米国特許第6,008,336号を参照されたい)により提供されるものが挙げられる。リポフェクションは、例えば、米国特許第5,049,386号、同第4,946,787号、及び同第4,897,355号に記載されており、リポフェクション試薬は市販されている(例えば、Transfectam(商標)及びLipofectin(商標))。免疫脂質複合体などの標的リポソームを含む、脂質：核酸複合体の調製は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される通りである。

30

【0177】

ガイドRNA、RNAガイドDNA結合剤、及びドナー構築物を含む様々な送達系(例えば、ベクター、リポソーム、LNP)はまた、単独でまたは組み合わせて、インビボで細胞に送達するための生物に投与され得るか、またはエクスピボで細胞もしくは細胞培養物に投与され得る。投与は、限定されないが、注射、注入、局所適用、及びエレクトロポレーションを含む、血液、液体、または細胞との最終的な接触に分子を導入するために通常使用される経路のうちのいずれかによるものである。そのような核酸を投与する好適な方法が利用可能であり、当業者に周知である。

40

【0178】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書で開示される組成物のうちのいずれかをコードするDNAもしくはRNAベクター、例えば、本明細書に記載されるガイド配列のいずれか1つ以上を含むガイドRNA、または第IX因子をコードする配列を含む構築物(例えば、双方向性構築物)を提供する。いくつかの実施形態では、ベクターはまた、R

50

NAガイドDNA結合剤をコードする配列を含む。ある特定の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される組成物のうちのいずれか1つ以上を、または任意の組み合わせでコードするDNAまたはRNAベクターを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えば、プロモーター、エンハンサー、及び制御配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物を含むベクターは、第IX因子発現を促進するプロモーターを含まない。例えば、第IX因子ポリペプチドの発現は、宿主細胞のプロモーター（例えば、導入遺伝子が宿主細胞のアルブミン遺伝子座に組み込まれるときの内因性アルブミンプロモーター）によって促進される。いくつかの実施形態では、双方向性核酸構築物は、各々が導入遺伝子上流にスプライスアクセプターを有する第1のセグメント及び第2のセグメントを含む。ある特定の実施形態では、スプライスアクセプターは、宿主細胞のセーフハーバー部位のスプライスドナー配列、例えば、ヒトアルブミン遺伝子のイントロン1のスプライスドナーと適合性である。いくつかの実施形態では、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を含むベクターは、本明細書に開示されるように、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列（複数可）も含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に記載されるガイドRNAをコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、ガイドRNAの1つのコピーを含む。他の実施形態では、ベクターは、ガイドRNAの1つを超えるコピーを含む。1つを超えるガイドRNAを有する実施形態では、ガイドRNAは、それらが非同一であり、異なる標的配列を標的化するようであってもよく、それらが同一の標的配列を標的化する点において同一であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターが、1つを超えるガイドRNAを含む場合、各ガイドRNAは、Cas RNP複合体などのRNAガイドDNAヌクレアーゼとの複合体内の活性または安定性などの他の異なる特性を有し得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、プロモーター、3' UTR、または5' UTRなどの少なくとも1つの転写または翻訳の制御配列に作動可能に連結されてもよい。一実施形態では、プロモーターは、trRNAプロモーター、例えば、trNALys³、またはtrNAキメラであってもよい。Mefferd et al., RNA. 2015 21:1683-9、Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35:2620-2628を参照されたい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、RNAポリメラーゼIII（PolIII）によって認識され得る。PolIIIプロモーターの非限定的な例は、U6及びH1プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのU6プロモーターに作動可能に連結され得る。他の実施形態では、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、マウスまたはヒトのH1プロモーターへと作動可能に連結され得る。1つを超えるガイドRNAを有する実施形態では、発現を促進するために使用されるプロモーターは、同一または異なってもよい。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのcrRNAをコードするヌクレオチド及びガイドRNAのtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のベクター上に提供され得る。いくつかの実施形態では、crRNAをコードするヌクレオチド及びtrRNAをコードするヌクレオチドは、同一のプロモーターによって促進され得る。いくつかの実施形態では、crRNA及びtrRNAは、単一の転写産物へと転写され得る。例えば、crRNA及びtrRNAは、二重分子ガイドRNAを形成するように単一の転写産物から加工され得る。代替的に、crRNA及びtrRNAは、単一分子ガイドRNA（sgRNA）へと転写され得る。他の実施形態では、crRNA及びtrRNAは、同一のベクター上のそれらの対応するプロモーターによって促進され得る。さらに他の実施形態では、crRNA及びtrRNAは、異なるベクターによってコードされ得る。

【0180】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAをコードするヌクレオチド配列は、Casタンパク質などのRNAガイドDNA結合剤をコードするヌクレオチド配列を含む同一の

ベクター上に配置され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNA及びCasタンパク質などのRNAガイドDNA結合剤の発現は、それら自体の対応するプロモーターによって促進され得る。いくつかの実施形態において、ガイドRNAの発現は、Casタンパク質などのRNAガイドDNA結合剤の発現を促進する同一のプロモーターによって促進され得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びCasタンパク質転写産物などのRNAガイドDNA結合剤は、単一の転写産物内に含まれ得る。例えば、ガイドRNAは、Casタンパク質転写産物などのRNAガイドDNA結合剤の非翻訳領域（UTR）内にあってもよい。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、転写産物の5'UTR内にあってもよい。他の実施形態では、ガイドRNAは、転写産物の3'UTR内にあってもよい。いくつかの実施形態では、転写産物の細胞内半減期は、その3'UTR内にガイドRNAを含み、それによって3'UTRの長さを短縮することによって低減することができる。さらなる実施形態では、ガイドRNAは、転写産物のイントロン内にあってもよい。いくつかの実施形態では、ガイドRNAが転写産物から適切にスプライシング除去されるように、ガイドRNAが内部に位置するイントロンにおいて、好適なスプライス部位が追加され得る。いくつかの実施形態では、Casタンパク質などのRNAガイドDNA結合剤と側頭の近接した同じベクターからのガイドRNAとの発現は、CRISPR RNP複合体のより効率的な形成を促進し得る。

【0181】

いくつかの実施形態では、ガイドRNA及び／またはRNAガイドDNA結合剤をコードするヌクレオチド配列は、第IX因子遺伝子を含む構築物を含む同一のベクター上に配置され得る。いくつかの実施形態では、同一のベクター上の第IX因子遺伝子を含む構築物と、ガイドRNA（及び／またはRNAガイドDNA結合剤）との近接性は、ガイドRNA／RNAガイドDNA結合剤によって作成される挿入部位への構築物のより効率的な挿入を促進し得る。

【0182】

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（複数可）と、RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAとを含み、RNAガイドDNA結合剤は、Cas9またはCpf1などのCasタンパク質であり得る。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（複数可）と、RNAガイドDNA結合剤をコードするmRNAとを含み、RNAガイドDNA結合剤は、Cas9またはCpf1などのCasタンパク質であり得る。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及びtrRNA（sgRNAであり得る）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分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及びtrRNAを含むか、またはそれらからなる核酸は、ベクター配列をさらに含み得、ベクター配列は、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAと共に自然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。

【0183】

いくつかの実施形態では、crRNA及びtrRNAは、1つのベクター内の非連続核酸によってコードされる。他の実施形態では、crRNA及びtrRNAは、連続核酸によってコードされ得る。いくつかの実施形態では、crRNA及びtrRNAは、単一の核酸の反対側の鎖によってコードされる。他の実施形態では、crRNA及びtrRNAは、単一の核酸の同一の鎖によってコードされる。

【0184】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に開示されるように、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性核酸構築物）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるドナー構築物（例えば、双方向性核酸構築物）に加えて、ベクターは、本明細書に記載のガイドRNAをコードする核酸、及び／またはRNA

10

20

30

40

50

ガイドDNA結合剤（例えば、Cas9などのCasヌクレアーゼ）をコードする核酸をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、RNAガイドDNA結合剤をコードする核酸は、本明細書に開示されるドナー構築物（例えば、双方向性構築物）を含むベクターとは別個のベクター上にそれぞれまたは両方にある。実施形態のうちのいずれかでは、ベクターは、本明細書に記載されるように、限定されないが、プロモーター、エンハンサー、制御配列を含む他の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ドナー構築物（例えば、双方向性構築物）の第IX因子の発現を促進しない。いくつかの実施形態では、ベクターは、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列（複数可）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（複数可）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）であり得る。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（複数可）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、Cas9などのCasヌクレアーゼであり得る。いくつかの実施形態では、Cas9は、Streptococcus pyogenes由来である（すなわち、SpyCas9）。いくつかの実施形態では、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNA（sgRNAであり得る）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分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及びtrRNAを含むか、またはそれらからなる核酸は、ベクター配列を含み得、ベクター配列は、crRNA、trRNA、またはcrRNA及びtrRNAと共に自然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。

【0185】

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

【0186】

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

10

20

30

40

50

い。例えば、ウイルスは、ヘルパーウイルスなしでベクターを増幅及びパッケージングすることが可能であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるベクター系はまた、ウイルス増幅及びパッケージングに必要なウイルスの構成要素をコードし得る。

【0187】

非限定的な例示的なウイルスベクターには、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ヘルパー依存性アデノウイルスベクター（HDA）、単純ヘルペスウイルス（HSV-1）ベクター、バクテリオファージT4、バキュロウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターが含まれる。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAVベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターであってもよい。

【0188】

いくつかの実施形態では、「AAV」は、全ての血清型、サブタイプ、及び天然に存在するAAV、ならびに組換えAAVを指す。「AAV」は、ウイルス自体またはその誘導体を指すために使用され得る。「AAV」という用語は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVを含む。AAVの様々な血清型のゲノム配列、ならびに天然末端反復（TR）、Repタンパク質、及びキャプシドサブユニットの配列は、当該技術分野で既知である。そのような配列は、文献またはGenBankなどの公開データベースに見出され得る。本明細書で使用される「AAVベクター」は、AAV起源ではない異種配列（すなわち、AAVに対して異種の核酸配列）を含むAAVベクターを指し、典型的には、目的の異種ポリペプチドをコードする配列を含む。構築物は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV3B、AAV4、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAVrh.64R1、AAVhu.37、AAVrh.8、AAVrh.32.33、AAV8、AAV9、AAV-DJ、AAV2/8、AAVrh10、AAVLK03、AV10、AAV11、AAV12、rh10、及びそれらのハイブリッド、鳥類AAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、及びヒツジAAVキャプシド配列を含み得る。一般に、異種核酸配列（導入遺伝子）は、少なくとも1つ、及び一般に2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接している。AAVベクターは、一本鎖（ssAAV）または自己相補的（scAAV）のいずれかであってもよい。

【0189】

いくつかの実施形態では、レンチウイルスは、非組み込み性であってもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、アデノウイルスは、全てのコードウイルス領域が、5'及び3'の末端逆位配列（ITR）から離れており、パッケージングシグナル（「I」）がウイルスから削除されてそのパッケージング能力が増加している、高クロニング能、または「ガットレス」アデノウイルスであってもよい。さらに他の実施形態では、ウイルスベクターは、HSV-1ベクターであってもよい。いくつかの実施形態では、HSV-1に基づいたベクターは、ヘルパー依存性であり、他の実施形態では、それはベクター非依存性である。例えば、パッケージング配列のみを保持するアンプリコンベクターは、パッケージングのために構造的な構成要素を有するヘルパーウイルスを必要とし、一方で、非必須のウイルス機能を除去した30kb欠失HSV-1ベクターは、ヘルパーウイルスを必要としない。さらなる実施形態では、ウイルスベクターは、バクテリオファージT4であってもよい。いくつかの実施形態では、バクテリオファージT4は、ウイルスの頭部が空であるとき、任意の直鎖状または環状DNAまたはRNA分子をパッケージングすることができる。さらなる実施形態では、ウイルスベクターは、バキュロウイルスベクターであってもよい。なおもさらなる実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターであって

もよい。より小さいクローニング能力を有する A A V またはレンチウイルスベクターを使用する実施形態では、本明細書に開示されるようなベクター系の全ての構成要素を送達するために 1 つを超えるベクターを使用する必要がある場合がある。例えば、1 つの A A V ベクターは、C a s タンパク質（例えば、C a s 9）などの R N A ガイド D N A 結合剤をコードする配列を含み得、一方で、第 2 の A A V ベクターは、1 つ以上のガイド配列を含み得る。

【0190】

いくつかの実施形態では、ベクター系は、細胞内で 1 つ以上のヌクレアーゼ構成要素の発現を促進することができる場合がある。いくつかの実施形態では、双方向性構築物は、任意にベクター系の一部として、細胞内でコード配列の発現を促進することができるプロモーターを含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、細胞内に組み込まれると 1 つ以上のコード配列の発現を促進するプロモーターを含まない（例えば、本明細書で例示されるように、アルブミン遺伝子座のイントロン 1 で挿入されるときなどに宿主細胞の内因性プロモーターを使用する）。いくつかの実施形態では、細胞は、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物細胞などの真核生物細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、真核生物細胞は、哺乳動物細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、真核生物細胞は、げっ歯類細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、真核生物細胞は、ヒト細胞であってもよい。異なる種類の細胞における発現を促進するための好適なプロモーターは、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、プロモーターは、野生型であってもよい。他の実施形態では、プロモーターは、より効率的または効果的な発現のために修飾されてもよい。さらに他の実施形態では、プロモーターは短縮されているが、依然としてその機能を維持し得る。例えば、プロモーターは、ウイルスへのベクターの適切なパッケージングに好適な通常のサイズまたは低減されたサイズを有し得る。

【0191】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に記載される C a s タンパク質（例えば、C a s 9）などの R N A ガイド D N A 結合剤をコードするヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターによってコードされるヌクレアーゼは、C a s タンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の 1 つのコピーを含み得る。他の実施形態において、ベクター系は、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列の 1 つを超えるコピーを含み得る。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも 1 つの転写または翻訳の制御配列へと作動可能に連結されてもよい。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも 1 つプロモーターへと作動可能に連結されてもよい。

【0192】

いくつかの実施形態では、ベクターは、本明細書に記載される異種第 I X 因子遺伝子を含む構築物のうちのいずれか 1 つ以上を含み得る。いくつかの実施形態では、第 I X 因子遺伝子は、少なくとも 1 つの転写または翻訳の制御配列へと作動可能に連結されてもよい。いくつかの実施形態では、第 I X 因子遺伝子は、少なくとも 1 つのプロモーターへと作動可能に連結されてもよい。いくつかの実施形態では、第 I X 因子遺伝子は、異種遺伝子の発現を促進するプロモーターに連結されない。

【0193】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的、誘導性、または組織特異的であってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な構成的プロモーターには、サイトメガロウイルス最初期プロモーター（C M V）、シミアンウイルス（S V 4 0）プロモーター、アデノウイルス主要後期（M L P）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（R S V）プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス（M M T V）プロモーター、ホスホグリゼリン酸キナーゼ（P G K）プロモーター、伸長因子アルファ（E F 1 a）プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能性

断片、または先行するもののいずれかの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、プロモーターは、CMVプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、短縮型CMVプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF1aプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターであってもよい。非限定的な例示的な誘導性プロモーターは、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導可能なものを含む。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、Tet-On（登録商標）プロモーター（Clontech）などの、低い基底（非誘導）発現レベルを有するものであってよい。

【0194】

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

【0195】

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

【0196】

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

【0197】

さらなる実施形態では、ベクター系は、それが特異的な組織に送達した後にのみ発現を開始するために、組織特異的プロモーターを含み得る。

【0198】

ガイドRNA、RNA結合DNA結合剤、または第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物を含むベクターは、個別にまたは任意の組み合わせで、リポソーム、ナノ粒子、エクソソーム、または微小胞によって送達され得る。ベクターはまた、脂質ナノ粒子（LNP）によって送達され得る。1つ以上のガイドRNA、RNA結合DNA結合剤（例えば、mRNA）、または異種タンパク質をコードする配列を含むドナー構築物は、個別にまたは任意の組み合わせで、リポソーム、ナノ粒子、エクソソーム、または微小胞によって送達され得る。1つ以上のガイドRNA、RNA結合DNA結合剤（例えば、mRNA）、または異種タンパク質をコードする配列を含むドナー構築物は、個別にまたは任意の組み合わせで、LNPによって送達され得る。

【0199】

脂質ナノ粒子（LNP）は、ヌクレオチド及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、RNAガイドDNA結合剤、及び／またはドナー構築物（例えば、双方向性構築物）のうちのいずれかの送達に使用され得る。いくつかの実施形態では、LNPは、組成物を核酸（例えば、DNAもしくはmRNA）、またはタンパク質（例えば、Casヌクレアーゼ）、または適切な場合タンパク質と共に核酸の形態で送達する。

【0200】

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及び／または本明細書に開示されるドナー構築物（例えば、双方向性構築物）のうちのいずれかを、単独でまたは組み合わせて、宿主細胞もしくは宿主細胞集団または対象に送達する方法が本明細書に提供され、構成要素のうちのいずれか1つ以上は、LNPと会合する。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、方法は、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Cas9またはCas9をコードする配列）をさらに含む。

【0201】

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及び／または本明細書に開示されるドナー構築物（例えば、双方向性構築物）のうちのいずれかを、単独または組み合わせて、LNPと共に含む組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Cas9またはCas9をコードする配列）をさらに含む。

【0202】

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)とも呼ばれる、(9Z,12Z)-3-((4,4-ビス(オクチルオキシ)ブタノイル)オキシ)-2-(((3-(ジエチルアミノ)プロポキシ)カルボニル)オキシ)メチル)プロピルオクタデカ-9,12-ジエノエート、または別のイオン性脂質を含む。例えば、PCT/US2018/053559(2018年9月28日出願)、WO/2017/173054、WO2015/095340、及びWO2014/136086の脂質、ならびにそこに提供される参照文献を参照されたい。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の陽イオン性脂質アミン対RNAホスフェートのモル比(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、陽イオン性及びイオン化可能という用語は、互換的であり、例えば、イオン性脂質は、pHに応じて陽イオン性である。

【0203】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される双方向性構築物と会合するLNPは、疾患または障害を治療するための医薬品の調製において使用するためのものである。疾患または障害は、血友病Bなどの第IX因子欠乏症であり得る。

【0204】

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、RNAガイドDNA結合剤、及び／または本明細書に開示されるドナー構築物（例えば、双方向性構築物）のうちのいずれかは、単独または組み合わせて、裸またはベクターの一部として、脂質ナノ粒子に製剤化されるか、または脂質ナノ粒子を介して投与され、例えば、WO/2017/173054を参照されたく、その内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0205】

いくつかの実施形態では、RNA成分及び脂質成分を含むLNP組成物が包含され、脂質成分は、生分解性イオン性脂質などのアミン脂質を含む。いくつかの例では、脂質成分は、生分解性、イオン性脂質、コレステロール、DSPC、及びPEG-DMGを含む。

【0206】

本明細書に開示されるガイドRNA、RNAガイドDNA結合剤（例えば、CasヌクレアーゼまたはCasヌクレアーゼをコードする核酸）、及び第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）は、同じまたは異なる系を使用して送達され得ることが明らかであろう。例えば、ガイドRNA、Casヌクレアーゼ、及び構築物は、同じベクター（例えば、AAV）によって担持され得る。あるいは、Casヌクレアーゼ（タンパク質またはmRNAとして）及び／またはgRNAは、プラスミドまたはLNPによって担持され得、一方、ドナー構築物は、AAVなどのベクターによって担持され得る。さらに、異なる送達系は、同じまたは異なる経路によって（例えば、注入によって、筋肉内注射、尾静脈注射、または他の静脈内注射など注射によって、腹腔内投与及び／または筋肉内注射によって）投与され得る。

【0207】

異なる送達系は、インビトロまたはインビボで、同時にまたは任意の逐次的順序で送達することができる。いくつかの実施形態では、ドナー構築物、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼは、インビトロまたはインビボで、同時に、例えば、1つのベクター、2つのベクター、個々のベクター、1つのLNP、2つのLNP、個々のLNP、またはそれらの組み合わせで送達され得る。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、ガイドRNA及び／またはCasヌクレアーゼをベクターとして及び／または単独でLNPと会合してまたは合わせてリボ核酸タンパク質（RNP）として送達する（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日以上）前に、ベクターとして及び／またはLNPと会合してインビボまたはインビトロで送達され得る。さらなる例として、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、ベクターとして、及び／または単独でLNPと会合してまたは合わせてリボ核酸タンパク質（RNP）として、構築物をベクターとして及び／またはLNPと会合して送達する（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日以上）前に、インビボまたはインビトロで送達され得る。

10

【0208】

いくつかの実施形態では、本開示はまた、本明細書に開示されるガイドRNAのうちのいずれかを投与するための医薬製剤も提供する。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、本明細書に開示されるように、RNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）と、治療用異種遺伝子のコード配列を含むドナー構築物とを含む。対象（例えば、ヒト対象）への送達に好適な医薬製剤は、当該技術分野で周知である。

20

【0209】

IV. 使用方法

本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤は、インビボまたはインビトロで、第IX因子核酸を宿主細胞または宿主細胞集団に導入するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤は、宿主細胞もしくは宿主細胞集団、またはそれを必要とする対象において第IX因子を発現するのに有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤は、血友病（例えば、血友病B）を治療することを必要とする対象においてそれを治療するのに有用である。本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤のうちのいずれか1つ以上の投与は、第IX因子タンパク質レベル及び／または第IX因子活性レベル、例えば、循環、血清、または血漿レベルを増加させる。いくつかの実施形態では、治療の実効性は、血清または血漿第IX因子活性を測定することによって評価され得、対象の第IX因子の血漿レベル及び／または活性の増加は、治療の実効性を示す。いくつかの実施形態では、治療の実効性は、血清もしくは血漿第IX因子タンパク質及び／または活性レベルを測定することによって評価され得、対象の第IX因子の血漿レベル及び／または活性の増加は、治療の実効性を示す。いくつかの実施形態では、治療の実効性は、aPTTアッセイにおける凝固機能及び／またはTGA-EAアッセイにおけるトロンビン生成を評価することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、治療の実効性は、第IX因子のレベルを評価することによって決定され得、例えば、循環第IX因子のレベルは、凝固及び／または免疫学的アッセイ、例えば、サンドイッチ免疫アッセイ、ELISA（例えば、実施例13を参照されたい）、MSD（例えば、実施例14を参照されたい）によって測定され得る。

30

40

【0210】

正常または健康な個体において、第IX因子活性及び抗原レベルは、成人ヒト血漿からのその精製に基づいて、約3～5 µg/mlである正常プール血漿の50～160%変化する。Amiral et al., Clin. Chem. 30 (9), 1512-16,

50

1984の表2、またOsterud et al., 1978も参照されたい。第IX因子活性及び／または抗原レベルの正常血漿レベルの50%未満を有する個体は、血友病を有するとして分類される。特に、約1%未満の活性因子を有する個体は、重度の血友病を有するとして分類され、一方、約1～5%の活性因子を有する個体は、中等度の血友病を有するとして分類される。軽度の血友病を有する個体は、活性凝固因子の正常レベルの約6～49%を有する。いくつかの実施形態では、循環因子IXのレベルは、凝固及び／または免疫学的アッセイによって測定することができ、これらの方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Simioni et al., NEJM 2009、Adcock et al., Coagulation Handbook, Esoterix Laboratory Services, 2006）。hFIXタンパク質を検出するための免疫学的方法、及び機能亢進型hFIXバリエーションの第IX因子活性を機能的に正規化する方法は、実施例13に見出される。いくつかの実施形態では、第IX因子、例えば、循環第IX因子は、凝固及び／または免疫学的アッセイ、例えば、サンドイッチ免疫アッセイ、ELISA（例えば、実施例13を参照されたい）、MSD（例えば、実施例14を参照されたい）によって測定され得る。

【0211】

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組成物及び方法は、血友病を有する対象における第IX因子の血漿レベルまたは第IX因子活性レベルを、正常レベルの約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%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%以上に増加させるのに有用である。

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物及び方法は、第IX因子活性及び／またはレベルを増加、例えば、循環FIXタンパク質レベルを約0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、または4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に増加させるのに有用である。FIXタンパク質レベルは、約150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ またはそれを超える $\mu\text{g}/\text{ml}$ を達し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物及び方法は、第IX因子タンパク質レベルを約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に増加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組成物及び方法は、第IX因子タンパク質レベルを約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に増加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組成物及び方法は、第IX因子タンパク質レベルを約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または約3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に増加させるのに有用である。例えば、本明細書に開示される組成物及び方法は、血友病を有する対象において第IX因子の血漿レベルを、約6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上に増加させるのに有用である。

【0213】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物及び方法は、血友病を有する対象における第IX因子活性及び／またはレベルの血漿レベルを、投与前の対象の第IX因子の血漿レベル及び／または活性と比較して、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約11%、約12%、約13%、約14%、約15%、約16%、約17%、約18%、約19%、約20%、約21%、約22

％、約 23％、約 24％、約 25％、約 26％、約 27％、約 28％、約 29％、約 30％、約 31％、約 32％、約 33％、約 34％、約 35％、約 36％、約 37％、約 38％、約 39％、約 40％、約 41％、約 42％、約 43％、約 44％、約 45％、約 46％、約 47％、約 48％、約 49％、約 50％、約 55％、約 60％、約 65％、約 70％、約 75％、約 80％、約 85％、約 90％、約 95％、約 100％、約 110％、約 120％、約 130％、約 140％、約 150％、約 160％、約 170％、約 180％、約 190％、約 200％以上増加させるのに有用である。

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物及び／または方法は、宿主細胞または宿主細胞集団における第ⅠX因子タンパク質及び／または第ⅠX因子活性を、宿主細胞または宿主細胞集団への投与前の第ⅠX因子レベル及び／または活性、例えば、正常レベルと比較して、約1％、約2％、約3％、約4％、約5％、約6％、約7％、約8％、約9％、約10％、約11％、約12％、約13％、約14％、約15％、約16％、約17％、約18％、約19％、約20％、約21％、約22％、約23％、約24％、約25％、約26％、約27％、約28％、約29％、約30％、約31％、約32％、約33％、約34％、約35％、約36％、約37％、約38％、約39％、約40％、約41％、約42％、約43％、約44％、約45％、約46％、約47％、約48％、約49％、約50％、約55％、約60％、約65％、約70％、約75％、約80％、約85％、約90％、約95％、約100％、約110％、約120％、約130％、約140％、約150％、約160％、約170％、約180％、約190％、約200％以上増加させるのに有用である。いくつかの実施形態では、細胞は、肝臓細胞または肝臓細胞集団である。いくつかの実施形態では、肝臓細胞は、肝細胞であるか、または肝臓細胞集団は、肝細胞である。

【0215】

いくつかの実施形態では、方法は、ガイドRNA及びRNAガイドDNA結合剤（Cas9ヌクレアーゼをコードするmRNAなど）をLNPで投与することを含む。さらなる実施形態では、方法は、双方向性FIX構築物などの第ⅠX因子タンパク質をコードするAAV核酸構築物を投与することを含む。ガイドRNAとCas9をコードするmRNAとを含むCRISPR/Cas9 LNPを静脈内投与することができる。AAV FIXドナー構築物を静脈内投与することができる。CRISPR/Cas9 LNPの例示的な投与は、約0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、または10 mpk（RNA）を含む。mg/kg及びmpkという単位は、本明細書で互換的に使用されている。FIXタンパク質をコードする核酸を含むAAVの例示的な投与は、約 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、及び 10^{14} vg/kgのMOIを含み、任意に、MOIは、約 1×10^{13} ～ 1×10^{14} vg/kgであり得る。

【0216】

いくつかの実施形態では、方法は、治療有効量の第ⅠX因子タンパク質を発現することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、個体において治療有効レベルの循環第ⅠX因子凝固活性を達成することを含む。特定の実施形態では、方法は、正常の少なくとも約5％～約50％の第ⅠX因子活性を達成することを含む。方法は、正常の少なくとも約50％～約150％の第ⅠX因子活性を達成することを含み得る。ある特定の実施形態では、方法は、患者のベースライン第ⅠX因子活性を上回る、正常な第ⅠX因子活性の少なくとも約1％～約50％、または正常な第ⅠX因子活性の少なくとも約5％～約50％、または正常な第ⅠX因子活性の少なくとも約50％～約150％の第ⅠX因子活性の増加を達成することを含む。

【0217】

いくつかの実施形態では、方法は、長期的な効果、例えば、少なくとも1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年、または2年の効果を達成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、長期的かつ持続的な様式で、例えば、少なくとも1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年、または2年の効果で治療効果を達成することをさらに含む。いくつかの実施形態で

は、循環第ⅠⅩ因子活性及び／またはレベルのレベルは、少なくとも1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月、1年以上安定する。いくつかの実施形態では、FⅠⅩタンパク質の定常状態活性及び／またはレベルは、少なくとも7日、少なくとも14日、または少なくとも28日までに達成される。さらなる実施形態では、方法は、単回投与後、少なくとも1、2、4、もしくは6ヶ月、または少なくとも1、2、3、4、もしくは5年間、第ⅠⅩ因子活性及び／またはレベルを維持することを含む。

【0218】

アルブミン遺伝子座への挿入を伴うさらなる実施形態では、個体の循環アルブミンレベルは、正常である。方法は、個体の循環アルブミンレベルを、正常な循環アルブミンレベルの±5%、±10%、±15%、±20%、または±50%以内に維持することを含み得る。ある特定の実施形態では、個体のアルブミンレベルは、少なくとも4週目、8週目、12週目、または20週目までに、未治療の個体のアルブミンレベルと比較して変化していない。ある特定の実施形態では、個体のアルブミンレベルは、一時的に低下し、次いで、正常レベルに戻る。特に、方法は、血漿アルブミンのレベルにおける有意な変化を検出しないことを含み得る。

【0219】

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、ドナー構築物（例えば、第ⅠⅩ因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、宿主細胞または宿主細胞集団に投与または送達することを含む、ヒトアルブミン遺伝子などのアルブミン遺伝子を修飾する（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、本発明は、本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第ⅠⅩ因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、宿主細胞または宿主細胞集団に投与または送達することを含む、ヒトアルブミンイントロン1などのアルブミンイントロン1領域を修飾する（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、本発明は、本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第ⅠⅩ因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、宿主細胞または宿主細胞集団に投与または送達することを含む、肝組織または肝細胞宿主細胞などのヒトセーフハーバーを修飾する（例えば、二本鎖切断を作成する）方法または使用を含む。アルブミン遺伝子座などのセーフハーバー遺伝子座内への挿入は、肝細胞または肝臓細胞などの宿主細胞または細胞集団に著しい有害な影響を与えることなく、第ⅠⅩ因子遺伝子の過剰発現を可能にする。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、ドナー構築物（例えば、第ⅠⅩ因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、宿主細胞または宿主細胞集団に投与または送達することを含む、ヒトアルブミン遺伝子座のイントロン1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、ガイドRNAは、ヒトアルブミン遺伝子座（配列番号1）のイントロン1内で結合する少なくとも15、16、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を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列

10

20

30

40

50

番号 34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び 97 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～33 からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 34～97 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群から選択される配列の少なくとも 15、16、17、18、19、または 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、ガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び 93～97 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2～5、10～17、21～27、及び 29～33 からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び 93～97 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、方法は、インビトロで行われる。いくつかの実施形態では、方法は、インビボで行われる。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第 I X 因子をコードする配列を含む双方向性構築物である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞などである。さらなる実施形態では、肝臓細胞は、肝細胞である。

【0220】

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、ドナー構築物（例えば、第 I X 因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及び RNA ガイド DNA 結合剤（例えば、Cas ヌクレアーゼ）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、第 I X 因子核酸を宿主細胞または宿主細胞集団に導入する方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、ヒトアルブミン遺伝子座（配列番号 1）のイントロン 1 内の領域に結合することができる少なくとも 15、16、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を含む。いくつかの実施形態では、ガイド RNA は、配列番号 2～33 からなる群から選択される配列の少なくとも 15、16、17、18、19、または 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、ガイド RNA は、配列番号 2～33 からなる群から選択される配列と少なくとも 95%、90%、85%、80%、または 75% 同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイド RNA は、配列番号 2、8、13、19、28、29、31、32、33 からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明

細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、方法は、インビトロである。いくつかの実施形態では、方法は、インビボである。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞であるか、または宿主細胞集団は、肝細胞などの肝臓細胞である。

【0221】

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、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）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、宿主細胞または宿主細胞集団において第IX因子を発現する方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、ヒトアルブミン遺伝子座（配列番号1）のイントロン1内の領域に結合することができる少なくとも15、16、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を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本

10

20

30

40

50

明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34〜97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34〜37、42〜49、53〜59、61〜69、74〜81、85〜91、及び93〜97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2〜5、10〜17、21〜27、及び29〜33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34〜37、42〜49、53〜59、61〜69、74〜81、85〜91、及び93〜97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、方法は、インビトロである。いくつかの実施形態では、方法は、インビボである。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞であるか、または宿主細胞集団は、肝細胞などの肝臓細胞である。

【0222】

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、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、それを必要とする対象に投与または送達することを含む、血友病（例えば、血友病B）を治療する方法または使用を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、ヒトアルブミン遺伝子座（配列番号1）のイントロン1内の領域に結合することができる少なくとも15、16、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を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2〜33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2〜33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列の少なくとも15、16、17、18、19、または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、ガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群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であるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるガイドRNAは、配列番号34～37、42～49、53～59、61～69、74～81、85～91、及び93～97からなる群から選択されるガイド配列を含む。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞であるか、または宿主細胞集団は、肝細胞などの肝臓細胞である。

【0223】

本明細書に記載されるように、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）、ガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤は、当該技術分野で既知の任意の好適な送達系及び方法を使用して送達され得る。組成物は、インビトロまたはインビボで、同時にまたは任意の逐次的順序で送達することができる。いくつかの実施形態では、ドナー構築物、ガイドRNA、及びCasヌクレアーゼは、インビトロまたはインビボで、同時に、例えば、1つのベクター、2つのベクター、個々のベクター、1つのLNP、2つのLNP、個々のLNP、またはそれらの組み合わせで送達され得る。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、ガイドRNA及び／またはCasヌクレアーゼをベクターとして及び／または単独でLNPと会合してまたは合わせてリボ核酸タンパク質（RNP）として送達する（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日以上）前に、ベクターとして及び／またはLNPと会合してインビボまたはインビトロで送達され得る。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、例えば、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、または4週間毎に、複数回投与で送達され得る。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、例えば、1週目、2週目、及び3週目などの1週間間隔で送達され得る。さらなる例として、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、ベクターとして、及び／または単独でLNPと会合してまたは合わせてリボ核酸タンパク質（RNP）として、構築物をベクターとして及び／ま

たはLNPと会合して送達する前（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14日以上）に、インビボまたはインビトロで送達され得る。いくつかの実施形態では、アルブミンガイドRNAは、例えば、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、または4週間毎に、複数の投与で送達され得る。いくつかの実施形態では、アルブミンガイドRNAは、例えば、1週目、2週目、及び3週目などの1週間間隔で送達され得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、複数回投与で送達され得、例えば、毎日、2日毎、3日毎、4日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、または4週間毎に送達され得る。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、例えば、1週目、2週目、及び3週目などの1週間間隔で送達され得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNA及びCasヌクレアーゼは、LNPと会合し、第IX因子ドナー構築物を送達する前に宿主細胞または宿主細胞集団に送達される。

10

【0224】

いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含み、第IX因子配列は、野生型第IX因子、例えば、配列番号700である。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、第IX因子をコードする配列を含み、第IX因子配列は、野生型第IX因子、例えば、配列番号701である。いくつかの実施形態では、配列は、第IX因子のバリエーションをコードする。例えば、バリエーションは、野生型第IX因子よりも増加した凝固活性を有する。例えば、バリエーション第IX因子は、配列番号701に対してR338位（例えばR338L）にアミノ酸置換などの1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号700、配列番号701、または配列番号702と80%、85%、90%、93%、95%、97%、99%同一であり、野生型第IX因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有する第IX因子バリエーションをコードする。いくつかの実施形態では、配列は、第IX因子の断片をコードし、断片は、野生型第IX因子と比較して、少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%、99%、100%以上の活性を有する。

20

【0225】

一例では、第IX因子タンパク質は、L6位及びV181位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位及びK265位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位及びK265位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、K265位及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、K265位及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、I383位及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、V181位、及びK265位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、V181位、及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、V181位、及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、K265位、及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、K265位、及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、L6位、I383位、及びE186位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位、K265位、及びI383位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位、K265位、及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、V181位、I383位、及びE186位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子タンパク質は、K265位、I383位、及びE185位にアミノ酸置換を含み得る。別の例では、第IX因子

30

40

50

【 0 2 2 6 】

10

【 0 2 2 7 】

20

【 0 2 2 8 】

50

、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、I 3 8 3 V 変異、及び E 1 8 5 D 変異を含み得る。

【0229】

特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、及び I 3 8 3 V 変異を含み得る。別の特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、I 3 8 3 V 変異、及び E 1 8 5 D 変異を含み得る。いくつかの実施形態では、第 I X 因子タンパク質は、配列番号 7 0 0 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 3 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % 同一であり、野生型第 I X 因子と比較して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 6 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれ以上の活性を有する。ある特定の実施形態では、第 I X 因子バリエーションは、配列番号 7 0 0 と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 3 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % 同一であり、野生型第 I X 因子と比較して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 6 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれ以上の活性を有し、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、I 3 8 3 V 変異、及び／または E 1 8 5 D 変異を含む。別の特定の例では、第 I X 因子タンパク質は、L 6 F 変異、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、及び I 3 8 3 V 変異を含み得る。ある特定の実施形態では、第 I X 因子バリエーションは、配列番号 7 0 0 と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 3 %、9 5 %、9 7 %、9 9 % 同一であり、野生型第 I X 因子と比較して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 6 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはそれ以上の活性を有し、V 1 8 1 I 変異、K 2 6 5 A 変異、及び I 3 8 3 V 変異を含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、肝臓細胞であるか、または宿主細胞集団は、肝臓細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞、または宿主細胞集団は、任意の好適な非分裂細胞である。本明細書で使用される場合、「非分裂細胞」は、末端分化され、分裂しない細胞、ならびに分裂しないが、細胞分裂及び増殖に再び入る能力を保持する静止細胞を指す。例えば、肝臓細胞は、（例えば、傷害または切除されたときに）分裂する能力を保持するが、典型的には分裂しない。有糸分裂細胞分裂中、相同組換えは、ゲノムが保護され、二本鎖切断が修復される機序である。いくつかの実施形態では、「非分裂」細胞は、相同組換え（H R）が、例えば、対照分裂細胞と比較して、細胞内で二本鎖 D N A 切断が修復される一次機序ではない細胞を指す。いくつかの実施形態では、「非分裂」細胞は、非相同性末端結合（N H E J）が、例えば、対照分裂細胞と比較して、細胞内で二本鎖 D N A 切断が修復される一次機序である細胞を指す。非分裂細胞型は、文献に記載されており、例えば、活性 N H E J 二本鎖 D N A 切断修復機序により記載されている。例えば、I y a m a , D N A R e p a i r (A m s t .) 2 0 1 3 , 1 2 (8) : 6 2 0 - 6 3 6 を参照されたい。いくつかの実施形態では、宿主細胞には、限定されないが、肝臓細胞、筋肉細胞、またはニューロン細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、宿主細胞、または宿主細胞集団は、マウス、カニクイザル、またはヒト肝細胞などの肝細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、マウス、カニクイザル、またはヒト筋細胞などの筋細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される任意の 1 つ以上のガイド R N A を、単独でまたは R N A ガイド D N A 結合タンパク質と組み合わせて含む宿主細胞組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるベクターのうちのいずれか 1 つ以上を含む宿主細胞組成物が本明細書に提供される。

【0231】

いくつかの実施形態では、ドナー構築物（例えば、双方向性構築物）は、A A V ベクター、例えば、A A V 8 などの核酸ベクター中で投与される。いくつかの実施形態では、ドナー構築物は、相同性アームを含まない。

【0232】

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、ヒトである。いくつかの実施形態では、対象は、ウシ、ブタ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコ、魚、または家禽である。

【0233】

いくつかの実施形態では、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）、ガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）、ガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤は、肝循環へと投与される。

【0234】

いくつかの実施形態では、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）、ガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤の単回投与は、第IX因子の発現を望ましいレベルに増加させるのに十分である。他の実施形態では、第IX因子をコードする配列を含むドナー構築物（例えば、双方向性構築物）、ガイドRNA、及びRNAガイドDNA結合剤を含む組成物の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。

【0235】

いくつかの実施形態では、本開示は、上述のように、本明細書に記載されるgRNA、ドナー構築物（例えば、第IX因子をコードする配列を含む双方向性構築物）、及びRNAガイドDNA結合剤（例えば、Casヌクレアーゼ）のうちのいずれか1つ以上を、血友病を治療するのに好適な追加の療法と共に含む併用療法を含む。例えば、本開示の方法は、他の止血剤、血液因子、及び薬剤の使用と組み合わせることができる。例えば、対象は、治療有効量の、第XI因子、第XII因子、プレカリクレイン、高分子量キニノゲン（HMWK）、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第XIII因子、第XI因子、第VIIa因子、及びフォンウィルブランド因子からなる群から選択される1つ以上の因子を投与され得る。

【0236】

いくつかの実施形態では、治療は、第XIa因子、第IXa因子、第XIa因子、第XIIIa因子、及び第VIIIIa因子、プレカリクレイン、ならびに高分子量キニノゲンを含む、内因性凝固経路の活性化因子、または組織因子、第VIIa因子、第Va因子、及び第XIa因子を含む、外因性凝固経路の活性化因子などの凝固促進剤を投与することをさらに含み得る。この説明及び例示的な実施形態は、限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書及び添付の実施形態の目的について、特に明記しない限り、本明細書及び実施形態で使用される量、パーセンテージ、または割合、及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、まだそれほど修飾されていない程度まで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、以下の明細書及び添付の実施形態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、及び均等論の適用を実施形態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。本発明は以下の態様も提供する。

【1】 第IX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法であって、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

ii) RNAガイドDNA結合剤と、

iii)

a) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、及び33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

b) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、及び33からなる群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、

c) 配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列、

d) 配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、

10

20

30

40

50

85%、80%、または75%同一である配列、

e) 配列番号2～33からなる群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、

f) 配列番号34～97からなる群から選択される配列、

g) 配列番号98～119からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

h) 配列番号98～119からなる群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、及び

i) 配列番号120～163からなる群から選択される配列、ならびに

j) 表2、表7、及び表8の配列番号からなる群から選択される配列、から選択される配列を含むガイドRNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、前記第IX因子核酸を前記細胞または前記細胞集団に導入する、前記方法。

[2] 細胞または細胞集団において第IX因子を発現する方法であって、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

ii) RNAガイドDNA結合剤と、

iii)

a) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、及び33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

b) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、及び33からなる群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、

c) 配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列、

d) 配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

e) 配列番号2～33からなる群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、

f) 配列番号34～97からなる群から選択される配列、

g) 配列番号98～119からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

h) 配列番号98～119からなる群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、ならびに

i) 配列番号120～163からなる群から選択される配列、

l) 表2、表7、及び表8の配列番号からなる群から選択される配列、から選択される配列を含むガイドRNA (gRNA) と、を投与することを含み、

それにより、細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、前記方法。

[3] 前記投与が、インビトロである、[1] または[2]に記載の方法。

[4] 前記gRNAが、

a) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

b) 配列番号2、8、13、19、28、29、31、32、33からなる群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、

c) 配列番号34、40、45、51、60、61、63、64、65、66、72、77、83、92、93、95、96、及び97からなる群から選択される配列、

d) 配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列、

e) 配列番号2～33からなる群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、及び

f) 配列番号34～97からなる群から選択される配列、から選択される配列を含むガイド配列を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

〔５〕 前記核酸構築物が、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕 前記RNAガイドDNA結合剤が、Cas9またはCas9をコードする核酸である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕 前記RNAガイドDNA結合剤が、前記RNAガイドDNA結合剤をコードする核酸である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法。

〔８〕 前記RNAガイドDNA結合剤をコードする前記核酸が、mRNAである、〔７〕に記載の方法。

〔９〕 前記mRNAが、修飾mRNAである、〔８〕に記載の方法。

〔１０〕 前記RNAガイドDNA結合剤、及び／またはgRNAが、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の方法。

10

〔１１〕 前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、〔５〕～〔１０〕のいずれかに記載の方法。

〔１２〕 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、〔１１〕に記載の方法。

〔１３〕 前記AAVベクターが、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV-DJ、及びAAV2／8からなる群から選択される、〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕 前記ウイルスベクターが、AAVベクターである、〔１３〕または〔１４〕に記載の方法。

20

〔１５〕 前記核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAが、任意の順序及び／または任意の組み合わせで逐次的に投与される、〔１〕～〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１６〕 前記核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAが、個々にまたは任意の組み合わせで、同時に投与される、〔１〕～〔１４〕のいずれかに記載の方法。

〔１７〕 前記RNAガイドDNA結合剤、または組み合わせたRNAガイドDNA結合剤及びgRNAが、前記核酸構築物を投与する前に投与される、〔１〕～〔１６〕のいずれかに記載の方法。

〔１８〕 前記核酸構築物が、前記gRNA及び／またはRNAガイドDNA結合剤を投与する前に投与される、〔１〕～〔１７〕のいずれかに記載の方法。

30

〔１９〕 前記RNAガイドDNA結合剤が、Casヌクレアーゼである、〔１〕～〔１８〕のいずれかに記載の方法。

〔２０〕 前記Casヌクレアーゼが、クラス2のCasヌクレアーゼである、〔１９〕に記載の方法。

〔２１〕 前記Casヌクレアーゼが、Cas9である、〔１９〕または〔２０〕に記載の方法。

〔２２〕 前記Casヌクレアーゼが、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼである、〔２１〕に記載の方法。

〔２３〕 前記Casヌクレアーゼが、部位特異的DNA結合活性を有する、〔１９〕～〔２２〕のいずれかに記載の方法。

40

〔２４〕 前記Casヌクレアーゼが、ニッカーゼである、〔１９〕～〔２３〕のいずれかに記載の方法。

〔２５〕 前記Casヌクレアーゼが、クリベースである、〔１９〕～〔２３〕のいずれかに記載の方法。

〔２６〕 前記Casヌクレアーゼが、ニッカーゼまたはクリベース活性を有しない、〔１９〕～〔２３〕のいずれかに記載の方法。

〔２７〕 前記核酸構築物が、双方向性核酸構築物である、〔１〕～〔２６〕のいずれかに記載の方法。

〔２８〕 前記核酸構築物が、相同性非依存性ドナー構築物である、〔１〕～〔２７〕の

50

いずれかに記載の方法。

[29] 前記核酸構築物が、一本鎖または二本鎖である、[1]～[28]のいずれかに記載の方法。

[30] 前記核酸構築物が、一本鎖DNAまたは二本鎖DNAである、[1]～[29]のいずれかに記載の方法。

[31] 前記双方向性構築物が、前記第IX因子タンパク質の発現を促進するプロモーターを含まない、[1]～[30]のいずれかに記載の方法。

[32] 前記細胞または細胞集団が、異種シグナルペプチドを有する第IX因子を発現する、[1]～[31]のいずれかに記載の方法。

[33] 前記細胞または細胞集団が、アルブミンシグナルペプチドを有する第IX因子を発現する、[32]に記載の方法。

10

[34] 前記細胞または細胞集団が、任意に異種ペプチドと組み合わせて、第IX因子シグナルペプチドを有する第IX因子を発現する、[1]～[33]のいずれかに記載の方法。

[35] 前記細胞または細胞集団が、肝臓細胞であるか、または肝臓細胞を含む、[1]～[34]のいずれかに記載の方法。

[36] 前記肝臓細胞が、肝細胞である、[35]に記載の方法。

[37] 前記核酸が、野生型第IX因子タンパク質をコードする、[1]～[36]のいずれかに記載の方法。

[38] 前記核酸が、変異体第IX因子タンパク質をコードする、[1]～[36]のいずれかに記載の方法。

20

[39] 前記核酸が、変異R338Lを有する第IX因子タンパク質をコードする、[38]に記載の方法。

[40] 第IX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法であって、第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を前記細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、前記細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、前記方法。

[41] 細胞または細胞集団において第IX因子を発現する方法であって、第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を前記細胞または細胞集団に投与することを含み、それにより、前記細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、前記方法。

30

[42] 前記双方向性核酸構築物が、
a) 第IX因子のコード配列を含む第1のセグメント、及び
b) 第IX因子のコード配列の逆相補体を含む第2のセグメントを含み、
前記構築物が、前記第IX因子の発現を促進するプロモーターを含まない、[40]または[41]に記載の方法。

[43] 前記双方向性核酸構築物が、前記第IX因子のコード配列の上流にスプライスアクセプターを含む、[27]～[42]のいずれかに記載の方法。

[44] 例えば、RNAガイドDNA結合剤をコードする核酸として、RNAガイドDNA結合剤を投与することをさらに含む、[40]～[43]のいずれかに記載の方法。

[45] gRNAを投与することをさらに含む、[40]～[44]のいずれかに記載の方法。

40

[46] 前記双方向性核酸構築物が、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、[40]～[45]のいずれかに記載の方法。

[47] 前記RNAガイドDNA結合剤が、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、[40]～[46]のいずれかに記載の方法。

[48] 前記gRNAが、核酸ベクター及び／または脂質ナノ粒子中で投与される、[40]～[47]のいずれかに記載の方法。

[49] 前記核酸ベクターが、ウイルスベクターである、[46]～[48]のいずれかに記載の方法。

[50] 前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウ

50

イルスベクター、レトロウイルスベクター、及びレンチウイルスベクターからなる群から選択される、[49]に記載の方法。

[51] 前記AAVベクターが、AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV-DJ、及びAAV2/8からなる群から選択される、[50]に記載の方法。

[52] 前記ウイルスベクターが、AAVベクターである、[50]または[51]に記載の方法。

[53] 前記双方向性核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAが、任意の順序及び／または任意の組み合わせで逐次的に投与される、[40]～[52]のいずれかに記載の方法。

10

[54] 前記双方向性核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAが、任意の組み合わせで、同時に投与される、[40]～[52]のいずれかに記載の方法。

[55] 前記RNAガイドDNA結合剤、または組み合わせたRNAガイドDNA結合剤及びgRNAが、前記双方向性核酸構築物を投与する前に投与される、[40]～[53]のいずれかに記載の方法。

[56] 前記双方向性核酸構築物が、前記gRNA及び／またはRNAガイドDNA結合剤を投与する前に投与される、[40]～[53]のいずれかに記載の方法。

[57] 前記双方向性核酸構築物、RNAガイドDNA結合剤、及びgRNAが、任意の組み合わせで、互いに1時間以内に投与される、[40]～[56]のいずれかに記載の方法。

20

[58] 前記双方向性構築物が、前記第IX因子タンパク質の発現を促進するプロモーターを含まない、[40]～[57]のいずれかに記載の方法。

[59] 前記双方向性構築物が、一本鎖または二本鎖である、[40]～[58]のいずれかに記載の方法。

[60] 前記核酸構築物が、一本鎖DNAまたは二本鎖DNAである、[40]～[59]のいずれかに記載の方法。

[61] 前記gRNAが、配列番号2～33からなる群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、または配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、もしくは75%同一である配列を含む、[40]～[60]のいずれかに記載の方法。

30

[62] 第IX因子核酸を細胞または細胞集団に導入する方法であって、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物と、

ii) RNAガイドDNA結合剤と、

iii) セーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイドRNA(gRNA)と、を投与することを含み、

それにより、前記第IX因子核酸を前記細胞または前記細胞集団に導入する、前記方法。

[63] 細胞または細胞集団において第IX因子を発現する方法であって、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物と、

ii) RNAガイドDNA結合剤と、

iii) 前記細胞または細胞集団においてセーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイドRNA(gRNA)と、を投与することを含み、

40

それにより、前記細胞または細胞集団において第IX因子を発現する、前記方法。

[64] 前記投与が、インピトロである、[62]または[63]に記載の方法。

[65] 前記投与が、インピボである、[62]または[63]に記載の方法。

[66] 前記gRNAが、配列番号2～33からなる群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、または配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、もしくは75%同一である配列を含む、[62]～[65]のいずれかに記載の方法。

[67] 細胞において第IX因子を発現するのに使用するための組成物であって、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む核酸構築物と、

50

i i) RNAガイドDNA結合剤と、

i i i) 配列番号2～33からなる群から選択されるガイド配列、または配列番号2～33からなる群から選択される配列と少なくとも95%、90%、85%、80%、または75%同一である配列を含むガイドRNA (gRNA) と、を含む、前記組成物。

[68] 前記RNAガイドDNA結合剤が、RNAガイドDNA結合剤をコードする核酸である、[40]～[67]のいずれかに記載の方法または組成物。

[69] 前記RNAガイドDNA結合剤が、Casヌクレアーゼである、[40]～[68]のいずれかに記載の方法または組成物。

[70] 前記Casヌクレアーゼが、Casヌクレアーゼをコードする核酸である、[69]に記載の方法または組成物。

[71] 前記RNAガイドDNA結合剤が、CasヌクレアーゼをコードするmRNAである、[40]～[69]のいずれかに記載の方法または組成物。

[72] 前記mRNAが、修飾mRNAである、[71]に記載の方法または組成物。

[73] 前記Casヌクレアーゼが、クラス2のCasヌクレアーゼである、[69]～[72]のいずれかに記載の方法または組成物。

[74] 前記Casヌクレアーゼが、Cas9である、[69]～[73]のいずれかに記載の方法または組成物。

[75] 前記Casヌクレアーゼが、S. pyogenesヌクレアーゼ、S. aureusヌクレアーゼ、C. jejuniヌクレアーゼ、S. thermophilusヌクレアーゼ、N. meningitidisヌクレアーゼ、及びそれらのバリエーションからなる群から選択される、[69]～[74]のいずれかに記載の方法または組成物。

[76] 前記Casヌクレアーゼが、S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼまたはそのバリエーションである、[75]に記載の方法または組成物。

[77] 前記Casヌクレアーゼが、部位特異的DNA結合活性を有する、[69]～[76]のいずれかに記載の方法または組成物。

[78] 前記Casヌクレアーゼが、ニッカーゼである、[69]～[77]のいずれかに記載の方法または組成物。

[79] 前記Casヌクレアーゼが、クリベースである、[69]～[77]のいずれかに記載の方法または組成物。

[80] 前記Casヌクレアーゼが、ニッカーゼまたはクリベース活性を有しない、[69]～[77]のいずれかに記載の方法。

[81] 細胞または細胞集団において第IX因子を発現するのに使用するための組成物であって、第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物を含む、前記組成物。

[82] [1]～[81]のいずれかに記載の方法によってまたは組成物を使用して作製された宿主細胞。

[83] 前記宿主細胞が、肝臓細胞である、[82]に記載の宿主細胞。

[84] 前記宿主細胞が、非分裂細胞型である、[82]または[83]に記載の宿主細胞。

[85] 前記宿主細胞が、前記双方向性構築物によってコードされる前記第IX因子ポリペプチドを発現する、[82]～[84]のいずれかに記載の宿主細胞。

[86] 前記宿主細胞が、肝細胞である、[82]～[85]のいずれかに記載の宿主細胞。

[87] 前記gRNAが、配列番号401を含む、[1]～[86]のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

[88] 第IX因子欠乏症を治療する方法であって、前記第IX因子欠乏症を有する個体に、

i) 第IX因子タンパク質コード配列を含む双方向性核酸構築物と、

i i) RNAガイドDNA結合剤またはRNAガイドDNA結合剤をコードする配列と、

i i i) セーフハーバー遺伝子座を標的とする配列を含むガイドRNA (gRNA) と

10

20

30

40

50

、を投与することを含み、

それにより、前記個体において前記第ⅠⅩ因子タンパク質を発現する、前記方法。

〔８９〕 治療有効量の前記第ⅠⅩ因子タンパク質を発現することを含む、〔８８〕に記載の方法。

〔９０〕 前記個体において治療有効レベルの循環第ⅠⅩ因子凝固活性を達成することを含む、〔８８〕または〔８９〕に記載の方法。

〔９１〕 前記個体が、ヒトである、〔８８〕～〔９０〕のいずれかに記載の方法。

〔９２〕 正常の少なくとも約１％、例えば、正常の少なくとも約５％の循環ＦⅠⅩ活性またはＦⅠⅩタンパク質レベルを達成することをさらに含む、〔８８〕～〔９１〕のいずれかに記載の方法。

10

〔９３〕 前記循環ＦⅠⅩ活性またはＦⅠⅩタンパク質レベルが、正常の約１５０％未満である、〔８８〕～〔９２〕のいずれかに記載の方法。

〔９４〕 正常の少なくとも約１％～約１５０％の循環ＦⅠⅩ活性またはＦⅠⅩタンパク質レベルを達成することをさらに含む、〔８８〕～〔９３〕のいずれかに記載の方法。

〔９５〕 前記個体のベースラインＦⅠⅩ活性を上回る、正常ＦⅠⅩ活性の少なくとも約１％のＦⅠⅩ活性の増加を達成することをさらに含む、〔８８〕～〔９４〕のいずれかに記載の方法。

〔９６〕 前記個体のベースラインＦⅠⅩ活性を上回る、正常ＦⅠⅩ活性の少なくとも約５０％のＦⅠⅩ活性の増加を達成することをさらに含む、〔８８〕～〔９５〕のいずれかに記載の方法。

20

〔９７〕 前記個体において、持続的かつ長期的な効果、例えば、少なくとも１ヶ月、２ヶ月、６ヶ月、１年、または２年の効果を達成することをさらに含む、〔８８〕～〔９６〕のいずれかに記載の方法。

〔９８〕 前記個体の循環アルブミンレベルが、前記双方向性核酸構築物の投与から少なくとも１ヶ月、２ヶ月、６ヶ月、または１年後に正常である、〔８８〕～〔９７〕のいずれかに記載の方法。

〔９９〕 前記個体の循環アルブミンレベルが、前記双方向性核酸構築物の投与から４週間後で維持される、〔８８〕～〔９９〕のいずれかに記載の方法。

〔１００〕 前記個体の循環アルブミンレベルが一時的に低下し、次いで、正常に戻る、〔８８〕～〔９９〕のいずれかに記載の方法。

30

〔１０１〕 前記ガイドＲＮＡが、配列番号２～３３からなる群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、〔８８〕～〔１００〕のいずれかに記載の方法。

〔１０２〕 前記ガイドＲＮＡが、配列番号２～３３からなる群から選択される配列と少なくとも９５％、９０％、８５％、８０％、または７５％同一である配列を含む、〔８８〕～〔１０１〕のいずれかに記載の方法。

〔１０３〕 前記ガイドＲＮＡが、配列番号２～３３からなる群から選択される配列を含む、〔８８〕～〔１０２〕のいずれかに記載の方法。

〔１０４〕 前記ガイドＲＮＡが、配列番号４０１または４０２を含む、〔１〕～〔１０３〕のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

40

〔１０５〕 前記第ⅠⅩ因子が、ヒト第ⅠⅩ因子である、〔１〕～〔１０４〕のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

〔１０６〕 前記第ⅠⅩ因子が、組換えヒト第ⅠⅩ因子である、〔１〕～〔１０５〕のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

〔１０７〕 前記第ⅠⅩ因子が、第ⅠⅩ因子の機能亢進型バリエーションである、〔１〕～〔１０６〕のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

〔１０８〕 前記第ⅠⅩ因子が、Ｒ３３８で置換を含むヒト第ⅠⅩ因子バリエーションである、〔１〕～〔１０７〕のいずれかに記載の方法、組成物、または宿主細胞。

〔１０９〕 個体における第ⅠⅩ因子欠乏症の治療のための、〔１〕～〔１０８〕のいずれかに記載の組成物または構築物の使用。

50

[110] 個体における血友病Bの治療のための、[1]～[109]のいずれかに記載の組成物または構築物の使用。

[111] 前記ガイドRNAが、配列番号2の核酸配列を含む、[1]～[110]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[112] 前記ガイドRNAが、配列番号3の核酸配列を含む、[1]～[111]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[113] 前記ガイドRNAが、配列番号4の核酸配列を含む、[1]～[112]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[114] 前記ガイドRNAが、配列番号5の核酸配列を含む、[1]～[113]のいずれかに記載の方法及び組成物。

10

[115] 前記ガイドRNAが、配列番号6の核酸配列を含む、[1]～[114]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[116] 前記ガイドRNAが、配列番号7の核酸配列を含む、[1]～[115]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[117] 前記ガイドRNAが、配列番号8の核酸配列を含む、[1]～[116]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[118] 前記ガイドRNAが、配列番号9の核酸配列を含む、[1]～[117]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[119] 前記ガイドRNAが、配列番号10の核酸配列を含む、[1]～[118]のいずれかに記載の方法及び組成物。

20

[120] 前記ガイドRNAが、配列番号11の核酸配列を含む、[1]～[119]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[121] 前記ガイドRNAが、配列番号12の核酸配列を含む、[1]～[120]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[122] 前記ガイドRNAが、配列番号13の核酸配列を含む、[1]～[121]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[123] 前記ガイドRNAが、配列番号14の核酸配列を含む、[1]～[122]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[124] 前記ガイドRNAが、配列番号15の核酸配列を含む、[1]～[123]のいずれかに記載の方法及び組成物。

30

[125] 前記ガイドRNAが、配列番号16の核酸配列を含む、[1]～[124]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[126] 前記ガイドRNAが、配列番号17の核酸配列を含む、[1]～[125]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[127] 前記ガイドRNAが、配列番号18の核酸配列を含む、[1]～[126]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[128] 前記ガイドRNAが、配列番号19の核酸配列を含む、[1]～[127]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[129] 前記ガイドRNAが、配列番号20の核酸配列を含む、[1]～[128]のいずれかに記載の方法及び組成物。

40

[130] 前記ガイドRNAが、配列番号21の核酸配列を含む、[1]～[129]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[131] 前記ガイドRNAが、配列番号22の核酸配列を含む、[1]～[130]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[132] 前記ガイドRNAが、配列番号23の核酸配列を含む、[1]～[131]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[133] 前記ガイドRNAが、配列番号24の核酸配列を含む、[1]～[132]のいずれかに記載の方法及び組成物。

[134] 前記ガイドRNAが、配列番号25の核酸配列を含む、[1]～[133]のいずれかに記載の方法及び組成物。

50

【135】 前記ガイドRNAが、配列番号26の核酸配列を含む、【1】～【134】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【136】 前記ガイドRNAが、配列番号27の核酸配列を含む、【1】～【135】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【137】 前記ガイドRNAが、配列番号28の核酸配列を含む、【1】～【136】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【138】 前記ガイドRNAが、配列番号29の核酸配列を含む、【1】～【137】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【139】 前記ガイドRNAが、配列番号30の核酸配列を含む、【1】～【138】のいずれかに記載の方法及び組成物。

10

【140】 前記ガイドRNAが、配列番号31の核酸配列を含む、【1】～【139】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【141】 前記ガイドRNAが、配列番号32の核酸配列を含む、【1】～【140】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【142】 前記ガイドRNAが、配列番号33の核酸配列を含む、【1】～【141】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【143】 前記ガイドRNAが、配列番号2～5、10～17、21～27、及び29～33からなる群からの核酸配列を含む、【1】～【142】のいずれかに記載の方法及び組成物。

【0237】

20

ヒト第IX因子タンパク質配列（配列番号700）NCBI参照番号NP_000124：

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL
ERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCP
FGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGR
VSVSQTSKLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPW

QVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRII
PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIA DKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVF
HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
GTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLT

30

ヒト第IX因子ヌクレオチド配列（配列番号706）NCBI参照番号NM_000133）：

40

50

1 accacttttca caatctgcta gcaaagggtta tgcagcgcgt gaacatgatac atggcagaat
 61 caccaggcct catcaccatc tgccttttag gatatctact cagtgtctgaa tgtacagttt
 121 ttcttgatca tgaaaacgcc aacaaaattc tgaatcggcc aaagagggtat aattcaggta
 181 aattggaaga gtttgttcaa gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa agtgttagtt
 241 ttgaagaagc acgagaagtt ttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tgggaagcagt
 301 atgttgatgg agatcagtgat gaggccaatc catgttttaa tggcggcagt tgcgaagatg
 361 acattaattc ctatgaatgt tgggtgccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag
 421 atgtaacatg taacattaag aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgcctgata
 481 acaagggtgg ttgctcctgt actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtccctgtg
 541 aaccagcagt gccatttcca tggggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcacc
 601 gtgctgagac tgtttttcct gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt
 661 tggataacat cactcaaagc acccaatcat ttaatgactt cactcgggtt gttgggtggag
 721 aagatgccaa accagggtcaa ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgat
 781 tctgtggagg ctctatcgtt aatgaaaaat ggattgtaac tgcgtccac tgtgttga
 841 ctggtgttaa aattacagtt gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag
 901 agcaaaagcg aaatgtgatt cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctaatata
 961 agtacaacca tgacattgcc cttctggaac tggacgaacc cttagtgtca aacagctacg
 1021 ttacacctat ttgcattgct gacaaggaat acacgaacat cttcctcaaa tttggatctg
 1081 gctatgtaag tggctgggga agagtcttcc acaaaggag atcagcttta gttcttcagt
 1141 accttagagt tccacttgtt gaccgagcca catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct
 1201 ataacaacat gttctgtgct ggcttccatg aaggaggtag agattcatgt caaggagata
 1261 gtggggggacc ccatgttact gaagtgaag ggaccagttt cttaactgga attattagct
 1321 ggggtgaaga gtgtgcaatg aaaggcaaat atggaatata tacciaaggtat tcccggtatg
 1381 tcaactggat taaggaaaaa acaaagctca cttaatgaaa gatggatttc caaggttaat
 1441 tcattggaat tgaaaattaa cagggcctct cactaaacta tcaacttccc atcttttgtt
 1501 agatttgaat atatacattc tatgatcatt gctttttctc ttacagggg agaatttcat
 1561 attttacctg agcaaatga ttagaaaatg gaaccactag aggaatataa tgtgttagga
 1621 aattacagtc atttctaagg gccagccct tgacaaaatt gtgaagttaa attctccact
 1681 ctgtccatca gatactatgg ttctccacta tggcaactaa ctactcaat tttccctcct
 1741 tagcagcatt ccatcttccc gatcttctt gcttctccaa ccaaaacatc aatgtttatt
 1801 agttctgtat acagtacagg atctttggtc tactctatca caaggccagt accacactca
 1861 tgaagaaaga acacaggagt agctgagagg ctaaaactca tcaaaaacac tactcctttt
 1921 cctctaccct attcctcaat cttttacctt ttccaaatcc caatcccaa atcagttttt
 1981 ctctttctta ctccctctct cctttttacc ctccatggtc gttaaaggag agatggggag
 2041 catcattctg ttatacttct gtacacagtt atacatgtct atcaaaccca gacttgcttc
 2101 cgtagtggag acttgctttt cagaacatag ggatgaagta aggtgcctga aaagtttggg
 2161 ggaaaagttt ctttcagaga gtttaagttat ttatatata taatatata ataaaatata
 2221 taatatataa taaaatata tagtggtgtg gtatgcgtgt gtgtagacac acagcctac
 2281 acacatataa tgggaagcaat aagccattct aagagcttgt atggttatgg aggtctgact
 2341 aggcagatgatt tcacgaaggc aagattggca tatcattgta actaaaaaag ctgacattga
 2401 ccagacata ttgtactctt tctaaaaata ataataataa tgctaacaga aagaagagaa
 2461 cgtttcgttt gcaatctaca gctagtagag actttgagga agaattcaac agtgtgtctt
 2521 cagcagtggt cagagccaag caagaagttg aagttgccta gaccagagga cataagtatc
 2581 atgtctcctt taactagcat acccgaagt ggagaagggt gcagcaggct caaaggcata
 2641 agtcaattcca atcagccaac taagttgtcc ttttctggtt tcgtgttcac catggaacat
 2701 tttgattata gttaatcctt ctatcttgaa tcttctagag agttgtgtac caactgacgt
 2761 atgtttccct ttgtgaatta ataaactggt gttctgggtc at

10

20

30

ヒト第ⅠX因子ポリペプチド（配列番号701）

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERITTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINS
 YECWCPFGFEGKNCELDVTNCIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVS

40

VSQTSKLTAEVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDA
 FCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIETEHTQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLSNYVTPICADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTI
 YNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVYNWIKET
 TKLT

【実施例】

【0238】

以下の実施例は、ある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。

【0239】

50

実施例 1－材料及び方法

クローニング及びプラスミド調製

ITRに隣接する双方向性挿入構築物を合成し、商業的ベンダーによってpUC57-Kanにクローニングした。得られた構築物(P00147)を、他のベクターの親クローニングベクターとして使用した。他の挿入構築物(ITRを含まない)も商業的に合成し、pUC57にクローニングした。精製したプラスミドをBglII制限酵素(New England BioLabs、カタログ番号R0144S)で消化し、挿入構築物を親ベクターにクローニングした。プラスミドをStbl3(商標)Chemically Competent E. coli(Thermo Fisher、カタログ番号C737303)中で増殖させた。

【0240】

AAV生成

HEK293細胞におけるトリプルトランスフェクションを使用して、AAV8及びAAV-DJ生成のための目的の構築物と共にゲノムをパッケージングし、得られたベクターを、イオジキサノール勾配超遠心分離法により溶解細胞及び培養培地の両方から精製した(例えば、Lock et al., Hum Gene Ther. 2010 Oct; 21(10):1259-71を参照されたい)。目的の構築物を有するゲノムを含んだトリプルトランスフェクションで使用されるプラスミドは、実施例において「PXXXX」数で参照され、例えば、表9も参照されたい。単離したAAVを貯蔵緩衝液(0.001%Pluronic F68を含むPBS)中で透析した。ITR領域内に位置するプライマー/プローブを使用して、qPCRによってAAV力価を決定した。

【0241】

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を含むキャップされたポリアデニル化Streptococcus pyogenes(「Spy」)Cas9 mRNAを、直鎖状化プラスミドDNAテンプレート及びT7 RNAポリメラーゼを使用してインビトロ転写によって生成した。一般に、T7プロモーター及び100ntポリ(A/T)領域を含むプラスミドDNAを、37℃でXbaIと共にインキュベートし、消化を完了させ、続いて、65℃でXbaIの熱不活性化を完了させることによって直鎖状化した。直鎖状化プラスミドを、酵素及び緩衝塩から精製した。Cas9修飾mRNAを生成するためのIVT反応物を、37℃で4時間、以下の条件でインキュベートした: 50ng/μLの直鎖状化プラスミド、各2mMのGTP、ATP、CTP、及び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。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を精製した。あるいは、Cas9 mRNAをLiCl沈殿、酢酸アンモニウム沈殿、及び酢酸ナトリウム沈殿を使用して、またはLiCl沈殿法を使用して精製し、続いて、タンジェント流濾過によりさらなる精製を行った。転写物濃度を、260nmでの光吸光度を測定することによって決定し(Nanodrop)、転写物をBioanalyzer(Agilent)によるキャピラリー電気泳動によって分析した。

【0242】

以下のCas9 mRNAは、Cas9 ORF配列番号703もしくは配列番号704、またはPCT/US2019/053423(参照により本明細書に組み込まれる)の表24の配列を含む。

【0243】

Cas9 mRNA及びgRNAの送達のための脂質製剤

Cas9 mRNA及びgRNAを、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、イオン性脂質(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、及びPEG2k-DMGを含む脂質製剤を利用して、細胞及び動物に送達した。

【0244】

予め混合された脂質製剤(本明細書では「脂質パッケージ」と称される)を利用する実験について、本明細書にさらに記載されるように、構成要素を、約6.0の脂質アミン対RNAリンホスフェート(N:P)モル比でRNAカーゴ(例えばCas9 mRNA及びgRNA)と混合される前に、50:38:9:3のイオン性脂質:コレステロール:DSPC:PEG2k-DMGのモル比で100%エタノール中で再構成した。

【0245】

脂質ナノ粒子(LNP)として製剤化された構成要素を利用する実験について、構成要素を、様々なモル比で、100%エタノール中に希釈した。RNAカーゴ(例えば、Cas9 mRNA及びgRNA)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。

【0246】

実施例2に記載される実験について、Precision Nanosystems NanoAssembler(商標) Benchtop Instrumentを使用し、製造者のプロトコルに従って、脂質及びRNA溶液をマイクロ流体混合することによって、LNPを形成した。差動流量を使用して、混合中、水性溶媒対有機溶媒の2:1の比を維持した。混合後、LNPを収集し、水中に希釈し(約1:1v/v)、室温で1時間保持し、さらに水で希釈した(約1:1v/v)後、最終緩衝液交換を行った。50mMのTris、45mMのNaCl、5%(w/v)のスクロース、pH7.5(TSS)への最終緩衝液交換を、PD-10脱塩カラム(GE)を用いて完了した。必要な場合、Amicon 100kDa遠心フィルター(Millipore)で遠心分離することによって、製剤を濃縮した。次いで、得られた混合物を0.2µmの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで-80℃で保存した。LNPを、約4.5の脂質アミン対RNAホスフェート(N:P)モル比、及び1:1のgRNA対mRNAの重量比で、45:44:9:2のイオン性脂質:コレステロール:DSPC:PEG2k-DMGのモル比で製剤化した。

【0247】

他の実施例に記載される実験について、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溶液及び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(WO2016010840の図2を参照されたい)。LNPを室温で1時間保持し、さらに水で希釈した(約1:1v/v)。希釈したLNPを、フラットシートカートリッジ(Sartorius、100kD MWCO)上でタンジェント流濾過を使用して濃縮し、次いで、透析濾過により、50mMのTris、45mMのNaCl、5%(w/v)のスクロース、pH7.5(TSS)へと緩衝液交換した。あるいは、TSSへの最終緩衝液交換をPD-10脱塩カラム(GE)を用いて完了した。必要な場合、Amicon 100kDa遠心フィルター(Millipore)で遠心分離することによって、製剤を濃縮した。次いで、得られた混合物を0.2µmの滅菌フィルターを使用して濾過した。最終LNPを、さらなる使用まで4℃または-80℃で保存した。LNPを、約6.0の脂質アミン対RNAホスフェート(N:P)モル比、及び1:1のgRNA対mRNAの重量比で、50:38:9:3のイオン性脂質:コレステロール:DSPC:PEG2k-DMGのモル比で製剤化した。

10

20

30

40

50

【0248】

Cas9 mRNA、gRNA、及び挿入構築物の細胞培養及びインビトロ送達

Hepa1-6細胞

Hepa1-6細胞を、96ウェルプレート中に10,000細胞/ウェルの密度で播種した。24時間後、細胞をLNP及びAAVで処理した。処理前に、培地をウェルから吸引した。LNPを、DMEM+10%FBS培地中で4ng/μlに希釈し、さらに、10%FBS(DMEM中)中で2ng/μlに希釈し、37℃で10分間(5%FBSの最終濃度で)インキュベートした。AAVの標的MOIは1e6であり、DMEM+10%FBS培地中で希釈した。2ng/μlで50μlの上記希釈LNPを細胞に添加し(合計100ngのRNAカーゴを送達する)、続いて、50μlのAAVを添加した。LNP及びAAVの処理は、数分間隔であった。細胞中の培地の総体積は100μlであった。処理後72時間及び処理後30日後、これらの処理した細胞からの上清を、以下に記載されるように、ヒトFIX ELISA分析のために収集した。

10

【0249】

初代肝細胞

初代マウス肝細胞(PMH)、初代カニクイザル肝細胞(PCH)、及び初代ヒト肝細胞(PHH)を解凍し、追加物質(ThermoFisher)を含む肝細胞解凍培地に再懸濁させ、続いて、遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化細胞を肝細胞播種培地及びサプリメントパック(ThermoFisher)に再懸濁した。細胞を計数し、PHHについては33,000細胞/ウェル、PCHについては50,000細胞/ウェル、及びPMHについては15,000細胞/ウェルの密度でBio-coat collagen Iでコーティングした96ウェルプレート上に播種した。播種した細胞を、37℃及び5%CO₂雰囲気での組織培養インキュベーター中で5時間放置し、接着させた。インキュベーション後、細胞を単層形成について調べ、肝細胞維持で3回洗浄し、37℃でインキュベートした。

20

【0250】

脂質パケット送達を利用する実験では、Cas9 mRNA及びgRNAを各々、維持培地中で2mg/mlに別々に希釈し、各々の2.9μlを、12.5μlの50mMクエン酸ナトリウム、200mMの塩化ナトリウム(pH5)、及び6.9μlの水を含むウェル(96ウェルのEppendorfプレート中)に添加した。次いで、12.5μlの脂質パケット製剤、続いて12.5μlの水、及び150μlのTSSを添加した。各ウェルを、肝細胞維持培地を使用して20ng/μl(総RNA含有量に関して)に希釈し、次いで、6%の新鮮なマウス血清で10ng/μl(総RNA含有量に関して)に希釈した。培地をトランスフェクションの前に細胞から吸引し、40μlの脂質パケット/RNA混合物を細胞に添加し、続いて、AAV(維持培地中で希釈した)を1e5のMOIで添加した。培地を、本明細書に記載されるように、分析のために処理後72時間に収集し、細胞をさらなる分析のために採取した。

30

【0251】

ルシフェラーゼアッセイ

細胞培地におけるNanoLuc検出を伴う実験では、1体積のNano-Glo(登録商標)ルシフェラーゼアッセイ基質を、50体積のNano-Glo(登録商標)ルシフェラーゼアッセイ緩衝液と組み合わせた。試料の1:10希釈(50μlの試薬+40μlの水+10μlの細胞培地)を使用して、0.5秒の積分時間でPromega GloMaxランナー上でアッセイを実行した。

40

【0252】

細胞培地中のHiBitタグの検出を伴う実験では、LgBITタンパク質及びNano-GloR HiBIT細胞外基質を、室温のNano-GloR HiBIT細胞外緩衝液中で、それぞれ1:100及び1:50に希釈した。試料の1:10希釈(50μlの試薬+40μlの水+10μlの細胞培地)を使用して、1.0秒の積分時間でPromega GloMaxランナー上でアッセイを実行した。

50

【0253】

LNP及び／またはAAVのインビボ送達

マウスに、AAV、LNP、AAV及びLNPの両方、またはビヒクル（AAVビヒクルについてはPBS+0.001%Pluronic、LNPビヒクルについてはTSS）を、外側尾静脈を介して投与した。AAVを、本明細書に記載される量（ベクターゲノム／マウス、「vg/ms」）で、1匹あたり0.1mLの体積で投与した。LNPをTSS中で希釈し、本明細書に示される量で、約5µL／グラム体重で投与した。典型的には、マウスに、まずAAVを注射し、次いで、適用可能な場合、LNPを注射した。治療後の様々な時点で、以下にさらに説明されるように、ある特定の分析のために血清及び／または肝臓組織を収集した。

10

【0254】

ヒト第IX因子（hFIX）ELISA分析

インビトロ研究では、細胞培地中に分泌される総ヒト第IX因子レベルを、製造者のプロトコルに従って、ヒト第IX因子ELISAキット（Abcam、カタログ番号ab188393）を使用して決定した。分泌hFIXレベルを、4パラメータロジスティックフィットを使用して標準曲線から定量化し、ng/mLの培地として表した。

【0255】

インビボ研究では、血液を収集し、示されるようにして血清または血漿を単離した。総ヒト第IX因子レベルを、製造者のプロトコルに従って、ヒト第IX因子ELISAキット（Abcam、カタログ番号ab188393）を使用して決定した。血清または血漿hFIXレベルを、4パラメータロジスティックフィットを使用して標準曲線から定量化し、µg/mLの血清として表した。

20

【0256】

次世代シーケンシング（「NGS」）及びオンターゲット切断効率の分析

ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集によって導入された挿入及び欠失（例えば、アルブミンのイントロン1内）の存在を同定した。標的部位の周りのPCRプライマーを設計し、目的のゲノム領域を増幅した。プライマー配列設計は、この分野で標準的に行われているように実施した。

【0257】

シーケンシングのために必要な化学的性質を付加するために製造者のプロトコル（Illumina）に従って追加のPCRを行った。アンプリコンをIllumina MiSeq装置でシーケンシングした。低品質スコアを有する読み取り値を除去した後に、読み取り値を参照ゲノムにアラインメントした。読み取り値を含む得られたファイルを、参照ゲノムに対してマッピングし（BAMファイル）、目的の標的領域と重なり合った読み取り値を選択し、野生型の読み取り値の数対挿入または欠失（「インデル」）を含む読み取り値の数を計算した。

30

【0258】

編集パーセンテージ（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値の総数に対する、挿入または欠失（「インデル」）を含む配列読み取り値の総数として定義される。

40

【0259】

in situハイブリダイゼーション分析

BaseScope（ACDbio, Newark, CA）は、例えば、挿入導入遺伝子（hFIX）及び挿入部位からのコード配列（例えば、アルブミンのエクソン1）を含むハイブリッドmRNA転写産物において、エクソン接合部の特異的検出を提供することができる、特殊なRNA in situハイブリダイゼーション技術である。BaseScopeを使用して、ハイブリッドmRNAを発現する肝臓細胞のパーセンテージを測定した。

【0260】

ハイブリッドmRNAを検出するために、双方向性構築物の挿入後に生じ得るハイブリ

50

ッドmRNAに対する2つのプローブを、ACDbio (Newark, CA) によって設計した。一方のプローブは、一方の配向での構築物の挿入から生じるハイブリッドmRNAを検出するように設計されたが、他方のプローブは、他方の配向での構築物の挿入から生じるハイブリッドmRNAを検出するように設計された。マウスの異なる群の肝臓を収集し、新鮮凍結して切片化した。製造者のプロトコルに従って、単一のプローブまたはプールされたプローブを使用して、BaseScopeアッセイを行った。スライドをスキャンし、HALOソフトウェアによって分析した。このアッセイの背景（生理食塩水処理群）は0.58%であった。

【0261】

実施例2－相同性アームのあり及びなしの挿入テンプレートのインビトロ試験

10

この実施例では、Hepa1-6細胞を培養し、Cas9 mRNA及びG000551を送達するLNPの存在下または不在下で、例えば、実施例1 (n=3) に記載されるように、様々な形態のAAVを有する挿入テンプレート（例えば、一本鎖ゲノム（「ssAAV」）または自己相補性ゲノム（「scAAV」）のいずれかを有する）で処理した。AAV及びLNPを実施例1に記載されるように調製した。処理後、実施例1に記載されるように、培地をヒト第IX因子レベルについて収集した。

【0262】

Hepa1-6細胞は、培養物中で分裂し続ける不死化マウス肝臓細胞株である。図2（治療後72時間の時点）に示されるように、200bpの相同性アームを含むベクター（プラスミドP00204に由来するscAAV）のみが、hFIXの検出可能な発現をもたらした。P00123（相同性アームを欠くscAAV）及びP00147（相同性アームを欠くssAAV双方向性構築物）に由来するAAVベクターの使用は、この実験でhFIXのいかなる検出可能な発現ももたらさなかった。細胞を培養中に維持し、これらの結果は、処理後30日で再アッセイしたときに確認された（データには示さず）。

20

【0263】

実施例3－相同性アームのあり及びなしの挿入テンプレートのインビボ試験

この実施例では、マウスを、実施例2でインビトロで試験されるのと同じプラスミド（P00123、P00204、及びP00147）に由来するAAVで処置した。投与物質を調製し、実施例1に記載されるように投与した。C57BL/6マウスに、各々、3e11ベクターゲノム（vg/ms）、続いてG000551（「G551」）を含むLNPを4mg/kgの用量（総RNAカーゴ含有量に関して）で投与した（各群についてn=5）。投与後4週間で、動物を安楽死させ、それぞれ、編集及びhFIX発現のために、肝臓組織及び血清を収集した。

30

【0264】

図3A及び表12に示されるように、マウスアルブミンのイントロン1を標的とするgRNAを含むLNPで処置した動物の各群において、約60%の肝臓編集レベルを検出した。しかしながら、各処置群においてロバストで一貫したレベルの編集にもかかわらず、LNP処置と組み合わせた相同性アームなしの双方向性ベクター（P00147に由来するssAAVベクター）を受けている動物は、血清中で最高レベルのhFIX発現をもたらした（図3B及び表13）。

40

【0265】

【表 3】

表 12. インデル%

テンプレート	平均インデル (%)	標準偏差インデル (%)
scAAV 平滑(P00123)	66.72	4.09
ssAAV 平滑(P00147)	68.10	2.27
ssAAV HR(P00204)	70.16	3.68
LNP のみ	68.24	6.47
ビヒクル	0.28	0.08

10

【0266】

【表 4】

表 13. 第 IX 因子レベル

テンプレート	平均第 IX 因子 (ug/mL)	標準偏差第 IX 因子 (ug/mL)
scAAV 平滑(P00123)	0.75	0.28
ssAAV 平滑(P00147)	2.92	1.04
ssAAV HR(P00204)	0.96	0.35
LNP のみ	0	0
ビヒクル	0	0

20

【0267】

実施例 4－相同性アームのあり及びなしの ssAAV 挿入テンプレートのインビボ試験
この実施例に記載される実験では、インビボで相同性アームを ssAAV ベクターに組み込む効果を調査した。

【0268】

この実験で使用された投与物質を調製し、実施例 1 に記載されるように投与した。C57BL/6 マウスに、3e11vg/ms、続いて G000666 (「G666」) または G000551 (「G551」) を含む LNP を 0.5mg/kg の用量 (総 RNA カーゴ含有量に関して) で投与した (各群について n=5)。投与後 4 週間で、hFIX 発現のために動物血清を収集した。

30

【0269】

図 4A 及び表 14 に示されるように、G551 によって標的化される部位への挿入のための、非対称相同性アーム (それぞれ、プラスミド P00350、P00356、及び P00362 に由来するベクターについては、300/600bp アーム、300/2000bp アーム、及び 300/1500bp アーム) を有する ssAAV ベクターの使用により、アッセイのための検出下限を下回った循環 hFIX のレベルが得られた。しかしながら、相同性アームなしで、かつ 2 つの hFIX オープンリーディングフレーム (ORF) を双方向配向で有する ssAAV ベクター (P00147 に由来する) の使用により、各動物における循環 hFIX の検出可能なレベルが得られた。

40

【0270】

同様に、G666 によって標的化される部位への挿入のための、非対称相同性アーム (それぞれ、プラスミド P00353 及び P00354 に由来するベクターについては 500bp アーム及び 800bp アーム) を有する ssAAV ベクターの使用により、相同性アーム (P00147 に由来する) なしの双方向性ベクターの使用と比較して、より低い検出可能なレベルが得られた (図 4B 及び表 15 を参照されたい)。

【0271】

50

【表 5】

表 14. -血清 hFIX レベル

AAV	平均血清 FIX (ug/mL)	標準偏差血清 FIX (ug/mL)
P00147	5.13	1.31
P00350	-0.22	0.08
P00356	-0.23	0.04
P00362	-0.09	0.16

10

【0272】

【表 6】

表 15. -血清 hFIX レベル

AAV	平均血清 FIX (ug/mL)	標準偏差血清 FIX (ug/mL)
P00147	7.72	4.67
P00353	0.20	0.23
P00354	0.46	0.26

20

【0273】

実施例 5 - 初代マウス肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物のインビトロスクリーニング

相同性アームを欠く双方向性構築物が他の配置を有するベクターを上回ることを実証したことにより、この実施例に記載される実験は、hFIX とアルブミンのエクソン 1 との間のハイブリッド転写産物を形成するために使用されるスプライスアクセプターを改変し、CRISPR/Cas9 媒介性挿入を標的とするための gRNA を改変する効果を調査した。これらの多様な双方向性構築物を、初代マウス肝細胞 (PMH) におけるマウスアルブミンのイントロン 1 を標的とする 20 個の異なる gRNA を利用して、標的部位のパネルにわたって試験した。

30

【0274】

この実施例で試験した ssAAV 及び脂質パッケージ送達物質を調製し、実施例 1 に記載されるように PMH に送達し、 1×10^5 の MOI で AAV と共に行った。処理後、単離されたゲノム DNA 及び細胞培地を、それぞれ編集及び導入遺伝子発現分析のために収集した。ベクターの各々は、実施例 1 に記載されるように、ルシフェラーゼに基づく蛍光検出により測定することができるレポーターを含み、図 5 C に相対ルシフェラーゼユニット (「RLU」) としてプロットした。ベクターは、hFIX ORF の 3' 末端で融合した HiBit ペプチドを含み、それは相対発現の感受性検出を可能にする。試験した各ベクターの概略図を図 5 A に提供する。試験した gRNA を、表 5 に列挙されるものについて短縮された数を使用して、図 5 B 及び 5 C に示す (例えば、先頭のゼロが省略されている、例えば、「G551」は表 5 の「G000551」に対応する)。

40

【0275】

図 5 B 及び表 16 に示されるように、試験した各組み合わせにわたって、処置群の各々について、一貫しているが様々なレベルの編集を検出した。テンプレート及びガイド RNA の様々な組み合わせを使用する導入遺伝子発現を図 5 C 及び表 17 に示す。図 5 D に示されるように、有意なレベルのインデル形成は、必ずしも導入遺伝子のより効率的な発現をもたらすものではなかった。P00411 由来テンプレート及び P00418 由来テンプレートを使用して、10%未満の編集を含むガイドが含まれない場合、 R^2 値は、それぞれ 0.54 及び 0.37 であった。マウスアルブミンスプライスアクセプター及びヒト FIX スプライスアクセプターは、各々、有効な導入遺伝子発現をもたらした。

50

【 0 2 7 6 】

【表 7】

表 16. -インデル%

ガイド ID	P00411		P00418		P00415	
	平均 インデル (%)	標準偏差 インデル (%)	平均 インデル (%)	標準偏差 インデル (%)	平均 インデル (%)	標準偏差 インデル (%)
G000551	67.4	1.42	70.67	2.29	66.73	4.90
G000552	90.93	0.15	91.10	2.43	90.37	1.01
G000553	77.80	3.83	77.47	1.87	80.50	0.85
G000554	72.37	6.49	70.53	3.16	70.60	2.91
G000555	35.37	2.63	35.77	9.34	40.47	4.75
G000666	62.47	3.87	50.90	19.41	65.90	3.99
G000667	30.57	2.73	25.30	3.67	31.67	2.29
G000668	63.60	2.02	66.65	4.60	68.30	4.90
G000669	19.10	2.51	19.33	1.53	18.70	1.25
G000670	47.80	3.27	49.10	4.42	51.97	2.06
G011722	4.20	0.72	4.27	1.20	4.20	0.26
G011723	5.63	1.27	6.07	0.15	5.93	0.15
G011724	6.10	1.28	8.50	2.69	7.13	1.27
G011725	1.93	0.29	2.60	0.79	2.53	0.65
G011726	10.73	1.46	11.70	0.50	12.43	1.33
G011727	14.20	1.56	14.80	2.36	16.20	2.69
G011728	10.55	1.20	13.65	0.92	15.50	1.56
G011729	5.00	0.10	5.63	0.25	6.00	1.01
G011730	7.83	0.97	9.13	0.59	7.33	0.59
G011731	23.70	0.66	25.27	1.21	24.87	1.01
AAV のみ	0.15	0.07	0.05	0.07	0.10	0.00

【 0 2 7 7 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 17. -ルシフェラーゼレベル

ガイド ID	P00411		P00418		P00415	
	平均 ルシフェ ラーゼ (RLU)	標準偏差 ルシフェ ラーゼ (RLU)	平均 ルシフェ ラーゼ (RLU)	標準偏差 ルシフェ ラーゼ (RLU)	平均 ルシフェ ラーゼ (RLU)	標準偏差 ルシフェ ラーゼ (RLU)
G000551	58000.00	4331.28	41800.00	2165.64	78633.33	20274.70
G000552	95700.00	10573.08	80866.67	27911.35	205333.33	30664.86
G000553	205333.33	52993.71	177333.33	32929.22	471666.67	134001.00
G000554	125333.33	55949.38	91933.33	19194.10	232666.67	67002.49
G000555	59933.33	11566.04	77733.33	11061.80	155666.67	15947.83
G000666	88500.00	28735.87	93266.67	30861.19	313000.00	15394.80
G000667	75333.33	22653.11	68966.67	27222.11	153000.00	30805.84
G000668	164000.00	56320.51	133400.00	65111.29	429000.00	120751.80
G000669	28933.33	11636.29	22033.33	2413.16	46466.67	6543.19
G000670	162666.67	32959.57	200000.00	33867.39	424666.67	36473.73
G011722	16766.67	3384.28	8583.33	4103.10	24000.00	8915.16
G011723	22733.33	7252.82	17133.33	4905.44	26100.00	8109.87
G011724	17300.00	2400.00	28033.33	9091.94	30933.33	3365.02
G011725	8253.33	1163.20	8890.00	1429.27	20366.67	13955.05
G011726	12223.33	3742.54	11610.00	2490.44	14950.00	8176.03
G011727	35600.00	8128.35	36300.00	12301.22	86700.00	5023.94
G011728	14900.00	5011.99	22466.67	7130.45	38166.67	13829.08
G011729	10460.00	2543.95	11223.33	2220.28	26966.67	16085.50
G011730	14833.33	2307.24	21700.00	8681.59	41233.33	25687.03
G011731	16433.33	3274.65	22566.67	2205.30	20756.67	13096.20
AAV のみ	217.00	15.56	215.00	15.56	207.00	1.41

【 0 2 7 8 】

実施例 6－標的部位にわたる双方向性構築物のインビボスクリーニング

この実施例で試験した ssAAV 及び LNP を調製し、実施例 1 に記載されるように C57BL/6 マウスに送達して、インビボで標的部位にわたる双方向性構築物の性能を評価した。投与後 4 週間で、動物を安楽死させ、それぞれ、編集及び hFIX 発現のために、肝臓組織及び血清を収集した。

【 0 2 7 9 】

初期実験では、アルブミンのイントロン 1 を標的とする 10 個の異なる gRNA を含む 10 個の異なる LNP 製剤を、P00147 に由来する ssAAV と共にマウスに送達した。AAV 及び LNP を、それぞれ、3 e11 v g / m s 及び 4 m g / k g (総 RNA カーゴ含有量に関して) で送達した (各群について n = 5)。この実験で試験した gRNA を図 6 に示し、表 18 に作表する。図 6 に示され、インビトロで観察されるように、有意なレベルのインデル形成は、導入遺伝子の挿入または発現について予測的でなかった。

【 0 2 8 0 】

別の実験では、実施例 5 でインビトロで試験した 20 個の異なる標的部位を標的とする 20 個の gRNA のパネルをインビボで試験した。この目的のために、アルブミンのイントロン 1 を標的とする 20 個の gRNA を含む LNP 製剤を、P00147 に由来する ssAAV と共にマウスに送達した。AAV 及び LNP を、それぞれ、3 e11 v g / m s

及び $1\text{ mg} / \text{kg}$ (総 RNA カーゴ含有量に関して) で送達した。この実験で試験した gRNA を図 7 A 及び 7 B に示す。

【0281】

図 7 A に示され、表 19 に作表されるように、試験した各 LNP / ベクターの組み合わせにわたって、処置群の各々について、様々なレベルの編集を検出した。しかしながら、図 7 B 及び表 20 に示され、実施例 5 に記載されるインビトロデータと一致するように、より高いレベルの編集は、必ずしもインビボで導入遺伝子のより高いレベルの発現をもたらすわけではなく、双方向性 hFIX 構築物の編集と挿入 / 発現との間の相関性の欠如を示す。実際、達成された編集の量と、図 7 D に提供されるプロットで見られる hFIX 発現の量との間には、ほとんど相関が存在しない。特に、10%未満の編集を達成する gRNA が分析から除去されるとき、この実験の編集データセットと発現データセットとの間で 0.34 のみの R^2 値を計算する。興味深いことに、図 7 C に示されるように、実施例 5 のインビトロ実験から RLU で測定される発現のレベルを、この実験で検出されたインビボでの導入遺伝子発現レベルと比較する相関プロットが提供され、 R^2 値は 0.70 であり、初代細胞スクリーニングとインビボ治療との間の正の相関を実証する。

【0282】

細胞レベルでの双方向性構築物の挿入を評価するために、処置された動物由来の肝臓組織を、*in situ* ハイブリダイゼーション法 (Base Scope) を使用して、例えば、実施例 1 に記載されるようにアッセイした。このアッセイは、hFIX 導入遺伝子とマウスアルブミンエクソン 1 配列との間の接合部を検出することができるプローブをハイブリッド転写産物として利用した。図 8 A に示されるように、ハイブリッド転写産物に対して陽性の細胞を、AAV 及び LNP の両方を受けた動物において検出した。具体的には、AAV のみを投与する場合、1.0%未満の細胞がハイブリッド転写産物に対して陽性であった。G011723、G000551、または G000666 を含む LNP の投与では、4.9%、19.8%、または 52.3% の細胞がハイブリッド転写産物に対して陽性であった。さらに、図 8 B に示されるように、循環 hFIX レベルは、ハイブリッド転写産物に対して陽性であった細胞の数と相関していた。最後に、アッセイは、いずれかの配向での双方向性 hFIX 構築物の挿入を検出することができるプールされたプローブを利用した。しかしながら、単一の配向のみを検出する単一のプローブを使用した場合、ハイブリッド転写産物に対して陽性であった細胞の量は、プールされたプローブを使用して検出された細胞の約半分であり (一実施例では、4.46% 対 9.68%)、双方向性構築物がいずれかの配向で挿入することが実際に可能であり、タンパク質レベルでの導入遺伝子発現の量と相関する発現されたハイブリッド転写産物をもたらすことを示唆している。これらのデータは、達成された循環 hFIX レベルが挿入に使用されるガイドに依存していることを示す。

【0283】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 18 -hFIX 血清レベル及びインデル%

ガイド	平均 インデル(%)	標準偏差 インデル(%)	平均 hFIX 血清レベル	標準偏差 hFIX 血清レベル
G000551	75.02	1.27	3.82	3.38
G000555	51.18	1.19	32.56	9.05
G000553	62.78	2.64	25.07	4.04
G000667	52.96	4.96	32.03	6.74
G000554	55.24	2.28	29.48	7.34
G000552	67.56	1.73	14.79	5.34
G000668	43.14	5.78	26.72	7.97
G000669	50.68	2.97	10.70	4.43
G000666	64.62	1.34	26.19	5.56
G000670	55.90	1.30	30.96	8.44

10

【 0 2 8 4 】

【表 1 0】

表 19 -肝臓編集%

ガイド	平均肝臓編集 (%)	標準偏差肝臓編集 (%)
G000551	59.48	4.02
G000555	58.72	3.65
G000553	51.26	2.81
G000554	33.04	8.76
G000555	12.72	4.46
G000666	53.60	4.92
G000667	26.74	4.98
G000668	39.22	3.04
G000669	33.34	4.77
G000670	47.50	5.58
G011722	10.34	1.68
G011723	4.02	0.84
G011724	2.46	0.64
G011725	8.26	1.24
G011726	6.90	1.01
G011727	13.33	6.43
G011728	35.78	9.34
G011729	4.62	1.46
G011730	12.68	3.14
G011731	26.70	1.86

20

30

40

【 0 2 8 5 】

50

【表 1 1】

表 20 -血清 hFIX レベル

ガイド	1 週目		2 週目		4 週目	
	平均 FIX (ug/mL)	標準偏差 FIX (ug/mL)	平均 FIX (ug/mL)	標準偏差 FIX (ug/mL)	平均 FIX (ug/mL)	標準偏差 FIX (ug/mL)
G000551	10.88	2.74	10.25	2.51	9.39	3.48
G000555	13.34	2.09	12.00	2.75	12.43	2.57
G000553	17.64	4.34	20.27	6.35	15.31	2.43
G000554	12.79	4.99	14.29	6.09	12.74	4.93
G000555	11.94	5.79	11.99	5.76	8.61	4.02
G000666	21.63	1.32	20.65	1.55	17.23	0.62
G000667	16.77	2.86	12.35	2.85	12.57	5.60
G000668	21.35	1.51	18.20	3.18	17.72	2.25
G000669	5.76	2.10	6.72	2.93	3.39	0.78
G000670	18.18	2.17	19.16	3.05	15.49	3.61
G011722	8.07	1.74	7.74	2.41	8.07	1.74
G011723	2.11	0.28	1.65	0.28	2.11	0.28
G011724	0.92	0.43	0.60	0.30	0.92	0.43
G011725	1.75	0.77	1.14	0.67	1.75	0.77
G011726	0.59	0.30	1.01	0.64	0.59	0.30
G011727	6.71	2.80	6.90	3.68	6.71	2.80
G011728	11.77	3.12	12.29	3.43	11.77	3.12
G011729	0.94	0.35	0.89	0.29	0.94	0.35
G011730	5.93	1.77	6.33	1.73	5.93	1.77
G011731	3.56	0.87	3.78	0.50	3.56	0.87
AAV のみ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ビヒクル	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ヒト血清	3.63	0.32	3.61	0.35	3.28	0.03

【0 2 8 6】

実施例 7 -インビボでの AAV 及び LNP 送達のタイミング

この実施例では、双方向性 hFIX 構築物を含む ssAAV の送達と LNP の送達との間のタイミングを、C57BL/6 マウスにおいて調査した。

【0 2 8 7】

この実施例で試験した ssAAV 及び LNP を調製し、実施例 1 に記載されるようにマウスに送達した。LNP 製剤は、G000551 を含み、双方向性テンプレートは、P00147 に由来する ssAAV として送達した。AAV 及び LNP を、それぞれ、3 e11 v g / m s 及び 4 m g / k g (総 RNA カargo 含有量に関して) で送達した (各群について n = 5)。「テンプレートのみ」コホートは AAV のみを受け、「PBS」コホートは AAV または LNP を受けなかった。1つのコホートは、0 日目に AAV 及び LNP を順次 (数分間隔で) 受け (「テンプレート + LNP 0 日目」)、別のコホートは、0 日目に AAV を受け、1 日目に LNP を受け (「テンプレート + LNP 1 日目」)、最終コホートは、0 日目に AAV を受け、7 日目に LNP を受けた (「テンプレート + LNP 7 日目」)。1 週間、2 週間、及び 6 週間で、hFIX 発現分析のために血漿を収集した。

【0 2 8 8】

図 9 に示されるように、hFIX は、AAV 送達後 7 日目に LNP を受けたコホートの 1 週間の時点を除いて、アッセイされた各時間に各コホートにおいて検出された。

【0289】

実施例8－AAVの送達後のLNPの複数回投与

この実施例では、ssAAVの投与後のLNPの反復投与の効果を調査した。

【0290】

この実施例で試験したssAAV及びLNPを調製し、実施例1に記載されるようにC57BL/6マウスに送達した。LNP製剤は、G000551を含み、ssAAVは、P00147に由来した。AAV及びLNPを、それぞれ、3e11vg/ms及び0.5mg/kg（総RNAカーゴ含有量に関して）で送達した（各群についてn=5）。「テンプレートのみ」コホートはAAVのみを受け、「PBS」コホートはAAVまたはLNPを受けなかった。1つのコホートは、さらなる処置なしで0日目にAAV及びLNPを順次（数分間隔で）受け（図10では「テンプレート+LNP（1回）」）、別のコホートは、0日目にAAV及びLNPを順次（数分間隔で）受け、7日目に2回目の用量を受け（図10では「テンプレート+LNP（2回）」）、最終コホートは、0日目にAAV及びLNPを順次（数分間隔で）受け、7日目にLNPの2回目の用量及び14日目にLNPの3回目の用量を受けた（図10では「テンプレート+LNP（3回）」）。AAVの投与後1、2、4、及び6週間で、hFIX発現分析のために血漿を収集した。

10

【0291】

図10に示されるように、hFIXは、アッセイされた各時間に各コホートにおいて検出され、複数の後続用量のLNPは、hFIX発現の量を著しく増加させなかった。

20

【0292】

実施例9－インビボでのhFIX発現の耐久性

この実施例では、処置された動物における経時的なhFIX発現の耐久性を評価した。この目的のために、1年間の耐久性研究の一部として、投与後の処置された動物の血清においてhFIXを測定した。

【0293】

この実施例で試験したssAAV及びLNPを調製し、実施例1に記載されるようにC57BL/6マウスに送達した。LNP製剤は、G000551を含み、ssAAVは、P00147に由来した。AAVを3e11vg/msで送達し、LNPを0.25または1.0mg/kg（総RNAカーゴ含有量に関して）のいずれかで送達した（各群についてn=5）。

30

【0294】

図11A及び表21に示されるように、hFIX発現を、両群について評価した各時点で41週間まで維持した。8週間で観察されるレベルの低下は、ELISAアッセイの変動性に起因すると考えられる。ELISAにより2週目及び41週目に血清アルブミンレベルを測定し、研究全体にわたって循環アルブミンレベルが維持されることを示した。

【0295】

図11B及び表22に示されるように、hFIX発現を、両群について評価した各時点で52週間まで維持した。

【0296】

40

50

【表 1 2】

表 21 FIX レベル

週	用量			
	0.25mpk LNP		1mpk LNP	
	平均 hFIX (ug/mL)	標準偏差 hFIX (ug/mL)	平均 hFIX (ug/mL)	標準偏差 hFIX (ug/mL)
2	0.48	0.21	2.24	1.12
4	0.55	0.18	2.82	1.67
8	0.40	0.17	1.72	0.77
12	0.48	0.20	2.85	1.34
20	0.48	0.27	2.45	1.26
41	0.79	0.49	4.63	0.95

10

【 0 2 9 7 】

【表 1 3】

表 22 -FIX レベル

週	用量			
	0.25mpk LNP		1mpk LNP	
	平均 hFIX (ug/mL)	標準偏差 hFIX (ug/mL)	平均 hFIX (ug/mL)	標準偏差 hFIX (ug/mL)
2	0.87	0.15	4.02	1.75
8	0.99	0.15	4.11	1.41
12	0.93	0.14	4.15	1.35
20	0.83	0.22	4.27	1.54
41	0.83	0.37	4.76	1.62
52	0.82	0.25	4.72	1.54

20

30

【 0 2 9 8 】

実施例 10 - インビボで h F I X 発現を調節するための様々な用量の A A V 及び L N P の効果

この実施例では、h F I X の発現を調節するための A A V 及び L N P の両方の用量を変化させる効果を C 5 7 B l / 6 マウスにおいて評価した。

【 0 2 9 9 】

この実施例で試験した s s A A V 及び L N P を調製し、実施例 1 に記載されるようにマウスに送達した。L N P 製剤は、G 0 0 0 5 5 3 を含み、s s A A V は、P 0 0 1 4 7 に由来した。A A V を 1 e 1 1、3 e 1 1、1 e 1 2、または 3 e 1 2 v g / m s で送達し、L N P を 0 . 1、0 . 3、または 1 . 0 m g / k g (総 R N A カーゴ含有量に関して) で送達した (各群について n = 5)。投与後 2 週間で、動物を安楽死させた。h F I X 発現分析のために、2 つの時点で血清を収集した。

40

【 0 3 0 0 】

図 1 2 A (1 週間)、図 1 2 B (2 週間)、及び表 2 3 に示されるように、A A V または L N P のいずれかの用量を変化させることにより、インビボでの h F I X の発現の量を調節することができる。

【 0 3 0 1 】

50

【表 1 4】

表 23. -血清 hFIX

時点	RNP 用量 (mg/kg)	AAV 用量 (MOI)	平均 FIX (ng/ml)	標準 偏差	N
1 週目	0.1	1E+11	0.08	0.02	2
		3E+11	0.11	0.04	5
		1E+12	0.41	0.15	5
		3E+12	0.61	0.17	5
	0.3	1E+11	0.36	0.14	5
		3E+11	0.67	0.26	5
		1E+12	1.76	0.14	5
		3E+12	4.70	2.40	5
	1.0	1E+11	3.71	0.31	4
		3E+11	8.00	0.51	5
		1E+12	14.17	1.38	5
		3E+12	20.70	2.79	5
	ヒト血清 1:1000		6.62	-	1
2 週目	0.1	1E+11	0.12	0.01	2
		3E+11	0.26	0.07	5
		1E+12	0.83	0.24	5
		3E+12	1.48	0.35	5
	0.3	1E+11	0.70	0.26	4
		3E+11	1.42	0.37	5
		1E+12	3.53	0.49	5
		3E+12	8.94	4.39	5
	1.0	1E+11	5.40	0.47	4
		3E+11	12.31	2.45	5
		1E+12	17.89	1.95	5
		3E+12	25.52	3.62	5
	ヒト血清 1:1000		4.47	-	1

【0 3 0 2】

実施例 1 1 - 初代カニクイザル及び初代ヒト肝細胞における標的部位にわたる双方向性構築物のインビトロスクリーニング

この実施例では、双方向性構築物を含む ssAAV ベクターを、それぞれ、初代カニクイザル（PCH）及び初代ヒト肝細胞（PHH）におけるカニクイザル（「cyno」）及びヒトアルブミンのイントロン 1 を標的とする gRNA を利用して、標的部位のパネルにわたって試験した。

【0 3 0 3】

この実施例で試験した ssAAV 及び脂質パッケージ送達物質を調製し、実施例 1 に記載されるように PCH 及び PHH に送達した。処理後、単離されたゲノム DNA 及び細胞培地を、それぞれ編集及び導入遺伝子発現分析のために収集した。ベクターの各々は、実施例 1 に記載されるように、ルシフェラーゼに基づく蛍光検出により測定することができるレポーターを含み（プラスミド P00415 に由来）、図 13B 及び 14B に相対ルシフェラーゼユニット（「RLU」）としてプロットした。例えば、AAV ベクターは、NanoLuc ORF を含んでいた（GFP に加えて）。試験したベクターの概略図を図 13B 及び 14B に提供する。試験した gRNA を、表 1 及び表 7 に列挙されるものについ

て短縮した数を使用して図の各々に示す。

【0304】

PCHについては図13A、及びPHHについては図14Aに示されるように、試験した組み合わせの各々について様々なレベルの編集を検出した（PCH実験で試験したいくつかの組み合わせについての編集データは、アンブリコンに基づくシーケンシングに使用したある特定のプライマー対の不良に起因して図13A及び表3に報告されない）。図13A及び14Aに図表で示される編集データは、以下の表3及び表4に数値的に再現される。しかしながら、図13B、13C、ならびに図14B及び14Cに示されるように、導入遺伝子の挿入または発現について有意なレベルのインデル形成は予測的ではなく、それぞれ、PCH及びPHHにおける双方向性構築物の編集と挿入／発現との間の相関がほとんどないことを示している。一尺度として、図13Cで算出した R^2 値は0.13であり、図14Dの R^2 値は0.22である。

10

【0305】

加えて、双方向性構築物を含むssAAVベクターを、初代ヒト肝細胞（PHH）におけるヒトアルブミンのイントロン1を標的とする単一ガイドRNAを利用して、標的部位のパネルにわたって試験した。

【0306】

ssAAV及びLNP物質を調製し、実施例1に記載されるようにPHHに送達した。処理後、単離されたゲノムDNA及び細胞培地を、それぞれ編集及び導入遺伝子発現分析のために収集した。ベクターの各々は、実施例1に記載されるように、ルシフェラーゼに基づく蛍光検出により測定することができるレポーターを含み（プラスミドP00415に由来）、図14Dに相対ルシフェラーゼユニット（「RLU」）としてプロットし、以下の図24に作表した。例えば、AAVベクターは、NanoLuc ORFを含んでいた（GFPに加えて）。試験したベクターの概略図を図13B及び14Bに提供する。試験したgRNAを、表1及び表7に列挙されるものについて短縮した数を使用して図14Dに示す。

20

【0307】

30

40

50

【表 1 5】

表 3. 初代カニクイザル肝細胞に送達された sgRNA についてのアルブミンイントロン 1 編集データ		
ガイド ID	編集平均%	編集標準偏差%
G009867	25.05	0.21
G009866	18.7	3.96
G009876	14.85	4.88
G009875	12.85	2.33
G009874	28.25	6.01
G009873	42.65	5.59
G009865	59.15	0.21
G009872	48.15	3.46
G009871	46.5	5.23
G009864	33.2	8.34
G009863	54.8	12.45
G009862	44.6	7.21
G009861	28.65	0.21
G009860	33.2	7.07
G009859	0.05	0.07
G009858	14.65	1.77
G009857	23	0.99
G009856	14.8	0.99
G009851	1.5	0.42
G009868	12.15	2.47
G009850	63.45	13.93
G009849	57.55	8.27
G009848	33	5.37
G009847	66.75	7
G009846	61.85	5.02
G009845	54.4	7.5
G009844	47.15	2.05

【 0 3 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 4. 初代ヒト肝細胞に送達された sgRNA についての アルブミンイントロン 1 編集データ		
ガイド ID	編集平均%	編集標準偏差%
G009844	19.07	2.07
G009851	0.43	0.35
G009852	47.20	3.96
G009857	0.10	0.14
G009858	8.63	9.16
G009859	3.07	3.50
G009860	18.80	4.90
G009861	10.27	2.51
G009866	13.60	13.55
G009867	12.97	3.04
G009868	0.63	0.32
G009874	49.13	0.60
G012747	3.83	0.23
G012748	1.30	0.35
G012749	9.77	1.50
G012750	42.73	4.58
G012751	7.77	1.16
G012752	32.93	2.27
G012753	21.20	2.95
G012754	0.60	0.10
G012755	1.10	0.10
G012756	2.17	0.40
G012757	1.07	0.25
G012758	0.90	0.10
G012759	2.60	0.35
G012760	39.10	6.58
G012761	36.17	2.43
G012762	8.50	0.57
G012763	47.07	3.07
G012764	44.57	5.83
G012765	19.90	1.68
G012766	8.50	0.28

【 0 3 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 17】

表 24. hAlb ガイドスクリーンルシフェラーゼ		
ガイド	平均 ルシフェラーゼ(RLU)	標準偏差 ルシフェラーゼ(RLU)
G009844	3700000	509116.9
G009852	281000	69296.46
G009857	1550000	127279.2
G009858	551000	108894.4
G009859	1425000	77781.75
G009860	2240000	183847.8
G009861	663500	238295
G009866	274000	11313.71
G009867	44700	565.6854
G009874	2865000	431335.1
G012747	651000	59396.97
G012749	867000	93338.1
G012752	4130000	268700.6
G012753	1145000	162634.6
G012757	579000	257386.9
G012760	129000	36769.55
G012761	4045000	728320
G012762	2220000	127279.2
G012763	1155000	205061
G012764	11900000	1555635
G012765	1935000	134350.3
G012766	2050000	169705.6
LNP	8430	212.132

【0310】

実施例 12 - 代替セーフハーバー遺伝子座からの第 I X 因子発現のインビボ試験

この実施例では、代替セーフハーバー遺伝子座における双方向性 h F I X 構築物を含む s s A A V の挿入を評価した。代替セーフハーバー遺伝子座への挿入を試験するために、A A V を上述のように調製した。マウスに、3 e 1 1 v g / マウスの用量で A A V を投与した後、直ちに C a s 9 m R N A 及びガイド R N A と共に製剤化された L N P を、0 . 3 m g / k g の用量で投与した。投与後 4 週間で動物を 殺し、肝臓及び血液試料を収集した。N G S により、肝臓試料中の編集を決定した。血清中のヒト h F I X レベルを E L I S A によって決定した。N G S 及び E L I S A データは、代替セーフハーバー遺伝子座内の h F I X の効果的な挿入及び発現を示した。

【0311】

実施例 13 - 非ヒト霊長類におけるヒト第 I X 因子遺伝子挿入のインビボ試験

この実施例では、様々なガイドを含むアデノ随伴ウイルス (A A V) 及び／または脂質ナノ粒子 (L N P) の投与によるカニクイザルにおけるヒト第 I X 因子遺伝子挿入及び h F I X タンパク質発現を評価するために、8 週間の研究を行った。この研究は、上述のように調製された L N P 製剤及び A A V 製剤で実施された。各 L N P 製剤は、2 : 1 の m R N A : g R N A の重量比で、C a s 9 m R N A 及びガイド R N A (g R N A) を含んでいた。s s A A V は、P 0 0 1 4 7 に由来した。

【0312】

雄のカニクイザルを $n = 3$ のコホートで処置した。動物に、表 10 に記載される用量でのゆっくりとしたボラス注射または注入によって AAV を投与した。AAV 処置後、動物は、ゆっくりとしたボラスまたは注入によって、表 10 に記載されるように緩衝液または LNP を受けた。

【0313】

投与後 2 週間で、単一の超音波ガイド下経皮生検により肝臓検体を収集した。各生検検体を液体窒素中でフラッシュ凍結し、 $-86 \sim -60^{\circ}\text{C}$ で保存した。前述のように、肝臓検体の編集分析を NGS シーケンシングによって行った。

【0314】

第 IX 因子 ELISA 分析のために、投与後 7 日目、14 日目、28 日目、及び 56 日目に動物から血液試料を収集した。採血後、血液試料を収集し、血漿に処理し、分析まで $-86 \sim -60^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0315】

ELISA により、全ヒト第 IX 因子レベルを血漿試料から決定した。簡潔には、Reacti-Bind 96 ウェルマイクロプレート (VWR カタログ番号 PI15041) を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で捕捉抗体 (ヒト第 IX 因子抗体に対するマウス mAb (HTI、カタログ番号 AHI X-5041)) でコーティングし、次いで、5% ウシ血清アルブミンを含む 1 倍 PBS を使用してブロックした。次に、カニクイザル血漿中で希釈した精製ヒト第 IX 因子タンパク質 (ERL、カタログ番号 HFI X 1009、ロット番号 HFI X 4840) の試験試料または標準物を、個々のウェル中でインキュベートした。検出抗体 (ヒツジ抗ヒト第 IX 因子ポリクローナル抗体、Abcam、カタログ番号 ab128048) を $100 \text{ ng}/\text{mL}$ の濃度で吸着した。二次抗体 (HRP を有するロバ抗ヒツジ IgG pAb、Abcam、カタログ番号 ab97125) を $100 \text{ ng}/\text{mL}$ で使用した。TMB 基質試薬セット (BD OptEIA カタログ番号 555214) を使用してプレートを現像した。光学密度を、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices i3 システム) 上で、 450 nm で分光光度的に評価し、SoftMax pro 6.4 を使用して分析した。

【0316】

インデル形成が検出され、編集が生じたことを確認した。NGS データは、効果的なインデル形成を示した。NHP におけるアルブミン遺伝子座からの hFI X の発現を、ELISA によって測定し、表 11 及び図 15 に示す。hFI X の血漿レベルは、治療的に有効であると以前に記載されたレベルに達した (George, et al., NEJM 377 (23), 2215-27, 2017)。

【0317】

測定されるように、循環 hFI X タンパク質レベルを、8 週間の研究にわたって維持し (それぞれ、7 日目、14 日目、28 日目、及び 56 日目の約 135、約 140、約 150、及び約 $110 \text{ ng}/\text{mL}$ の平均レベルを示す図 15 を参照されたい)、約 $75 \text{ ng}/\text{mL} \sim$ 約 $250 \text{ ng}/\text{mL}$ の範囲のタンパク質レベルを達成した。R338L 機能亢進型 hFI X バリエーションについて約 8 倍高い特異的活性を使用して、血漿 hFI X レベルを計算した (Simioni et al., NEJM 361 (17), 1671-75, 2009) (1 ミリグラムあたり $390 \pm 28 \text{ U}$ の hFI X-R338L のタンパク質特異的活性及び 1 ミリグラムあたり $45 \pm 2.4 \text{ U}$ の野生型第 IX 因子に対するタンパク質特異的活性を報告する)。この実施例で試験した機能亢進型第 IX 因子バリエーションの機能的に正規化された第 IX 因子活性を計算すると、実験は、野生型第 IX 因子活性の約 20 ~ 40% に対応する 8 週間の研究にわたる NHP における安定したレベルのヒト第 IX 因子タンパク質を達成した (野生型第 IX 因子活性の 12 ~ 67% に及ぶ範囲)。

【0318】

10

20

30

40

50

【表 18】

表 10 肝臓における編集

動物 ID	ガイド ID	F9-AAV (vg/kg)	F9-AAV 体積 (mL/kg)	LNP (mg/kg)	LNP 体積 (mL/kg)
4001	G009860	3E+13	1	3	2
4002	G009860	3E+13	1	3	2
4003	G009860	3E+13	1	3	2
5001	TSS	3E+13	1	0	0
5002	TSS	3E+13	1	0	0
5003	TSS	3E+13	1	0	0
6001	G009862	0	0	3	2
6002	G009862	0	0	3	2
6003	G009862	0	0	3	2

10

【0319】

【表 19】

表 11. hFIX 発現

動物 ID	7 日目 第 IX 因子 (ng/mL)	14 日目 第 IX 因子 (ng/mL)	28 日目 第 IX 因子 (ng/mL)	56 日目 第 IX 因子 (ng/mL)
4001	122.84/+2.85	94.93/+0.56	105.65/+1.94	97.31/+1.49
4002	149.77/+13.5	222.92/+9.61	252.49/+6.46	152.05/+7.46
4003	134.06/+6.17	107.04/+6.46	95.30/+3.18	74.23/+3.53
5001	ND	ND	ND	ND
5002	ND	ND	ND	ND
5003	ND	ND	ND	ND
6001	ND	ND	ND	ND
6002	ND	ND	ND	ND
6003	ND	ND	ND	ND

20

30

【0320】

実施例 14 非ヒト霊長類における第 IX 因子挿入のインビボ試験

この実施例では、P00147に由来するssAAV及び／またはG009860を含む様々なガイド及び様々なLNP成分を含むCRISPR/Cas9脂質ナノ粒子(LNP)の投与後の、カニクイザルにおける第IX因子遺伝子挿入及びhFIXタンパク質発現を評価するための研究を行った。

40

【0321】

インデル形成をNGSによって測定し、編集が生じたことを確認した。実施例13に記載されるように、ヒト第IX因子抗体(HTI、カタログ番号AHIX-5041)、ヒツジ抗ヒト第9因子ポリクローナル抗体(Abcam、カタログ番号ab128048)、及びHRPを有するロバ抗ヒツジIgG pAb(Abcam、カタログ番号ab97125)に対するマウスmAbを使用して、ELISAによって、総ヒト第IX因子レベルを血漿試料から決定した。実施例13の実験で達成されたものよりも3倍超高いヒトFIXタンパク質レベルを、代替のCRISPR/Cas9 LNPを使用して双方向性テンプレートから得た。この研究では、ELISAアッセイ結果は、ヒトFIXレベルの正常範囲(3~5ug/mL、Amiral et al., Clin. Chem., 30(

50

9)、1512-16、1984)以上の循環hFIXタンパク質レベルが、少なくとも14日目及び28日目の時点までにNHP中でG009860を使用して達成されたことを示す。初期データは、単回用量後14日目に約3~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の循環ヒトFIXタンパク質レベルを示し、レベル(約3~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)が研究の最初の28日にわたって維持された。ヒトFIXレベルを、同一方法によって研究の終了時に測定し、データを表25に表す。追加のガイドG009847、G009862、及びG009864もまた試験し、NHP研究におけるFIX発現テンプレートの挿入を容易にすることが示された。

【0322】

【表20】

表 25. 実施例 13 の血清ヒト第 IX 因子タンパク質レベル-ELISA 方法

	7 日目、 FIX ng/mL	標準 偏差	14 日目、 FIX ng/mL	標準 偏差	28 日目、 FIX ng/mL	標準 偏差	42 日目、 FIX ng/mL	標準 偏差	56 日目、 FIX ng/mL	標準 偏差
3001	2532.8	145.6	2562.6	99.0	3011.7	62.7	2936.7	72.4	2748.5	86.0
3002	2211.4	95.8	2958.5	119.2	3350.2	98.4	3049.7	112.7	3036.7	90.6
3003	3195.1	475.6	4433.9	238.7	3367.2	157.7	3746.1	95.6	3925.0	157.4

【0323】

ELISAにより循環アルブミンレベルを測定し、ベースラインのアルブミンレベルが28日の時点で維持されることを示した。研究において、未処置動物における試験されたアルブミンレベルは、±約15%変化した。処置された動物において、循環アルブミンレベルはわずかに変化し、正常範囲から落ちることなく、レベルは1ヶ月以内にベースラインに回復した。

【0324】

また、より大きなダイナミックレンジを有するサンドイッチ免疫アッセイによって、循環ヒトFIXタンパク質レベルを決定した。簡潔には、MSD GOLD 96ウェルStreptavidin SECTOR Plate (Meso Scale Diagnostics、カタログ番号L15SA-1)を、1%ECLブロッキング剤(Sigma、GERPN2125)でブロッキングした。ブロッキング溶液をタッピングして除いた後、ビオチン化捕捉抗体(Sino Biological、11503-R044)をプレート上に固定した。組換えヒトFIXタンパク質(Enzyme Research Laboratories、HFIX1009)を使用して、0.5%ECLブロッキング剤中の校正標準物質を調製した。洗浄後、校正標準物質及び血漿試料をプレートに添加し、インキュベートした。洗浄後、スルホタグ標識と複合体化した検出抗体(Hematologic Technologies、AHIX-5041)をウェルに添加し、インキュベートした。あらゆる非結合検出抗体を洗い流した後、リードバッファ-Tをウェルに適用した。いかなる追加のインキュベーションもなく、プレートをMSD Quick Plex SQ120機器で撮像し、データをDiscovery Workbench 4.0ソフトウェアパッケージ(Meso Scale Discovery)で分析した。濃度は、平均計算濃度として $\mu\text{g}/\text{m}$ で表される。試料については、アスタリスクで示されない限り、N=3であり、アスタリスクで示される場合はN=2である。MSD ELISAによって測定した場合の、処置した研究群におけるアルブミン遺伝子座からのhFIXの発現を表26に示す。

【0325】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 26. 血清ヒト第 IX 因子タンパク質レベル-MSD ELISA

	平均計算濃度(ug/mL)					
	3001		3002		3003	
時点	濃度	アッセイ間 CV	濃度	アッセイ間 CV	濃度	アッセイ間 CV
7 日目	7.85	20%	5.63	14%	11.20	26%
14 日目	8.65	15%	11.06	18%	14.70	28%
28 日目	9.14	7%	14.12	7%	10.85	25%
42 日目	9.03	10%	33.12*	0%	13.22	13%
56 日目	10.24	13%	16.72	12%	33.84*	4%

10

【0 3 2 6】

実施例 1 5 - アルブミンヒトガイドのオフターゲット分析

生化学的方法（例えば、Cameron et al., Nature Methods . 6、600-606；2017を参照されたい）を使用して、アルブミンを標的とする 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。この実験では、ヒトアルブミンを標的とする 13 個の sgRNA と、既知のオフターゲットプロファイルを有する 2 個の対照ガイドを、単離された HEK 293 ゲノム DNA を使用してスクリーニングした。生化学アッセイにおいて 16 nM のガイド濃度を使用して検出される潜在的なオフターゲット部位の数を表 27 に示した。このアッセイは、試験した sgRNA についての潜在的なオフターゲット部位を特定した。

20

【0 3 2 7】

【表 2 2】

表 27. オフターゲット分析

gRNA 番号	標的	ガイド配列(配列番号)	オフターゲット部位数
G012753	アルブミン	GACUGAAACUUCACAGAAUA (配列番号 20)	62
G012761	アルブミン	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU (配列番号 28)	75
G012752	アルブミン	UGACUGAAACUUCACAGAAU (配列番号 19)	223
G012764	アルブミン	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA (配列番号 31)	3985
G012763	アルブミン	UGGGCAAGGGAAGAAAAAA (配列番号 30)	5443
G009857	アルブミン	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC (配列番号 5)	131
G009859	アルブミン	UUAAUAAAGCAUAGUGCAA (配列番号 7)	91
G009860	アルブミン	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU (配列番号 8)	133
G012762	アルブミン	UGAUUCCUACAGAAAAACUC (配列番号 29)	68
G009844	アルブミン	GAGCAACCUCACUCUUGUCU (配列番号 2)	107
G012765	アルブミン	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA (配列番号 32)	41
G012766	アルブミン	UGAGCAACCUCACUCUUGUC (配列番号 33)	78
G009874	アルブミン	UAAUAAAAUCAAACAUCU (配列番号 13)	53
G000644	EMX1	GAGUCCGAGCAGAAGAAGAA (配列番号 1129)	304
G000645	VEGFA	GACCCCUCCACCCCGCCUC (配列番号 1130)	1641

30

40

【0 3 2 8】

上記で使用される生化学的方法などの既知のオフターゲット検出アッセイでは、多くの潜在的なオフターゲット部位は、典型的には、設計によって、他の状況、例えば、目的の初代細胞において検証され得る潜在的な部位について「広範囲のネットをキャストする」

50

ように回収される。例えば、生化学的方法は、典型的には、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、かつ使用される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、これらの方法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シーケンシングを使用して検証され得る。

【0329】

実施例16．インビボでのhF9挿入のためのガイドRNAをスクリーニングするためのヒト化アルブミンマウスの使用

ヒトアルブミン遺伝子座へのhF9挿入のための効果的なガイドRNAを同定することを目的とした。この目的のために、マウスアルブミン遺伝子座が第1のイントロンを含む対応するヒトアルブミンゲノム配列で置き換えられたマウスを利用した(ALB^{hu}/huマウス)。これにより、インビボでの成人肝臓の状況におけるヒトアルブミンの第1のイントロンを標的とするガイドRNAの挿入効率を試験することが可能になった。ALB^{hu}/huマウスを使用して、合計11個のガイドRNAをスクリーニングするために、各々がヒトアルブミン遺伝子座の第1のイントロンを標的とする、2個の別々のマウス実験を設定した。全てのマウスを体重測定し、実験の0日目に尾静脈を介して注射した。1週目、3週目、4週目、及び6週目に尾部出血を介して血液を収集し、血漿を分離した。マウスを7週目に殺した。大静脈を介して血液を収集し、血漿を分離した。肝臓及び脾臓も解剖した。

【0330】

第1の実験では、Cas9 mRNA及び以下のガイドを含む6個のLNPを、実施例1のように調製し、試験した：G009852、G009859、G009860、G009864、G009874、及びG012764。LNPを0.3mg/kgに希釈し(平均重量30グラムを使用して)、マウスあたり3E11ウイルスゲノムの用量で双方向性hF9挿入テンプレートでパッケージングしたAAV8と同時に注射した。群あたり、12～14週齢の5匹のALB^{hu}/hu雄マウスに注射した。同じコホートの5匹のマウスに、hF9に作動可能に連結されたCAGGプロモーターをパッケージングしたAAV8を注射し、これは、hF9のエピソーム発現をもたらす(マウスあたり3E11ウイルスゲノムで)。緩衝液単独、双方向性hF9挿入テンプレートでパッケージングしたAAV8単独、またはLNP-G009874単独を注射された群あたり3匹のマウスを含む3つの陰性対照群が存在した。

【0331】

実験では、Cas9 mRNA及び以下のガイドを含む以下のLNPを、実施例1のように調製し、試験した：G009860、G012764、G009844、G009857、G012752、G012753、及びG012761。全てを0.3mg/kgに希釈し(平均重量40グラムを使用して)、マウスあたり3E11ウイルスゲノムの用量で双方向性hF9挿入テンプレートでパッケージングしたAAV8と同時に注射した。群あたり5匹の30週齢のALB^{hu}/hu雄マウスに注射した。同じコホートの5匹のマウスに、hF9に作動可能に連結されたCAGGプロモーターをパッケージングしたAAV8を注射し、これは、hF9のエピソーム発現をもたらす(マウスあたり3E11ウイルスゲノムで)。緩衝液単独、双方向性hF9挿入テンプレートでパッケージングしたAAV8単独、またはLNP-G009874単独を注射された群あたり3匹のマウスを含む3つの陰性対照群が存在した。

【0332】

分析について、各時点でマウスにおけるhFIX循環のレベルを測定するためにELISAを行った。この目的のためにヒト第IX因子ELISAキット(ab188393)を使用し、全てのプレート陽性アッセイ対照としてGeorge King Bio-Medicalのヒトプール正常血漿で実行した。注射後6週目の各群における血漿試料中のヒト第IX因子発現レベルを、図16A及び図16Bに示す。インビトロ挿入データと一貫して、ガイドRNA G009852を使用した場合、検出された第IX因子血清レ

ベルは低レベルから全くなしであった。ヒトアルブミン中の隣接PAM配列の欠如と一貫して、ガイドRNA G009864を使用した場合、第IX因子血清レベルは検出不可であった。ガイドRNA G009859、G009860、G009874、及びG0012764を使用して、群について血清中の第IX因子発現を観察した。

【0333】

脾臓及び全ての肝臓の左外側葉の一部分を、次世代シーケンシング(NGS)分析のために提出した。NGSを使用して、AAV-hF9ドナー及びLNP-CRISPR/Cas9を注射した後の7週目のヒト化アルブミン遺伝子座における挿入/欠失(インデル)を有する肝臓細胞のパーセンテージを評価した。ヒトアルブミン中の隣接PAM配列の欠如と一貫して、ガイドRNA G009864を使用した場合、肝臓において編集は検出不可であった。ガイドRNA G009859、G009860、G009874、及びG0012764を使用して、群について肝臓における編集を観察した(データには示さず)。

【0334】

残りの肝臓を10%中性緩衝ホルマリン中で24時間固定し、次いで、70%エタノールに移した。別個の葉由来の4~5個の試料を切断し、Histowizに送り、処理され、パラフィンブロックに埋め込まれた。次いで、各パラフィンブロックから5ミクロン切片を切断し、一般的なBASESCOPE(商標)手順及びAdvanced Cell Diagnosticsによる試薬、ならびに成功した組み込み及び転写が達成されたときにALB^{hu}/huアルブミン遺伝子座の第1のイントロンからのヒトアルブミンシグナル配列と、hF9導入遺伝子との間に形成される固有のmRNA接合部を標的とするカスタム設計プローブを使用して、Ventana Ultra Discovery(Roche)上でBASESCOPE(商標)を行った。次いで、HALOイメージングソフトウェア(Indica Labs)を使用して、各試料中の陽性細胞のパーセンテージを定量化した。次いで、各動物の複数の葉にわたる陽性細胞のパーセンテージの平均を、7週目の血清中のhFIXレベルと相関させた。結果を図17及び表28に示す。hALB-hFIX mRNAの7週目の血清レベル及び陽性細胞%は、強く相関していた($r=0.89$ 、 $R^2=0.79$)。

【0335】

【表 2 3】

表 28. 7 週目の hFIX 及び BASESCOPE(商標)データ。

マウス	ガイド	hFIX ug/mL (7 週目)	mRNA プローブ (4~5 切片)%	mRNA プローブ 標準偏差%	総細胞数
1	緩衝液	ND	0.09	0.03	152833
4	AAV のみ	ND	0.53	0.67	351084
7	LNP のみ	ND	0.48	0.33	75160
10	CAG F9	211.8	0.20	0.22	190277
15	G009852	ND	0.30	0.09	144518
20	G009859	0.5	0.82	0.45	143817
21	G009859	0.5	0.88	0.43	160172
22	G009859	2.3	1.71	1.54	26015
23	G009859	3.8	2.74	0.59	183085
24	G009859	0.6	2.78	1.96	152424
25	G009860	5.6	12.46	5.80	78935
26	G009860	10.6	13.76	5.32	112252
27	G009860	9.7	14.80	5.45	201592
28	G009860	2.1	3.32	0.76	84710
29	G009860	3.0	1.52	0.35	203277
30	G009864	ND	1.94	1.78	145807
35	G009874	1.7	2.42	1.14	126665
36	G009874	1.5	1.08	0.53	195861
37	G009874	2.1	1.02	1.29	181679
38	G009874	5.5	0.40	0.43	175359
39	G009874	1.5	0.44	0.18	205417
40	G012764	15.7	28.85	7.11	167824
41	G012764	19.6	19.17	8.23	70081
42	G012764	1.9	1.95	1.79	154742
43	G012764	7.7	4.38	0.68	114060
44	G012764	3.0	1.64	1.04	238623
43	DapB(-)	--	0.12	0.07	144730

【0 3 3 6】

実施例 1 7-インビボでの挿入ヒト F 9 の機能性を評価するための F 9 ノックアウトマウスと交差したヒト化アルブミンマウスの使用

次の研究のために、挿入 h F 9 の機能性を、雄 A L B^{ms}/h u × F 9^{-/-}マウスで試験した。C a s 9 mRNA 及び以下のガイドを含む L N P を、実施例 1 のように調製し、試験した：G 0 0 9 8 6 0 (ヒトアルブミン遺伝子座の第 1 のイントロンを標的とする)、及び G 0 0 0 6 6 6 (マウスアルブミン遺伝子座の第 1 のイントロンを標的とする)。G 0 0 9 8 6 0 を 0.3 m g / k g に希釈し、G 0 0 0 6 6 6 を 1.0 m g / k g に希釈し (平均重量 3 1.2 グラムを使用して)、その両方を、マウスあたり 3 E 1 1 ウイルスゲノムの用量で双方向性 h F 9 挿入テンプレートでパッケージングした A A V 8 と同時注射した。群あたり、5 匹の A L B^{ms}/h u × F 9^{-/-}雄マウス (1 6 週齢) に注射した。同じコホートの 5 匹のマウスに、h F 9 に作動可能に連結された C A G G プロモーターをパッケージングした A A V 8 を注射し、これは、h F 9 のエピソーム発現をもたらす (マウスあたり 3 E 1 1 ウイルスゲノムで)。緩衝液のみまたは双方向性 h F 9 挿入テン

プレートでパッケージングした AAV8 のみを注射された群あたり 1 匹のマウスと、それぞれ、 0.3 mg/kg 及び 1.0 mg/kg で LNP-G009860 または LNP-G000666 のみを注射された群あたり 2 匹のマウスとを含む 6 匹の陰性対照動物が存在した。

【0337】

分析について、各時点でマウスにおける hFIX 循環のレベルを測定するために ELISA を行った。この目的のためにヒト第 IX 因子 ELISA キット (ab188393) を使用し、全てのプレートを陽性アッセイ対照として George King Bio-Medical のヒトプール正常血漿で実行した。脾臓及び全ての肝臓の左外側葉の一部分を NGS 分析のために提出した。

【0338】

注射後 1 週目、2 週目、及び 4 週目での各群における血漿試料中のヒト第 IX 因子発現レベルを、図 18 及び表 29 に示す。加えて、肝臓及び脾臓におけるアルブミン遺伝子座での挿入及び欠失 (インデル) レベルを示す NGS 結果を表 29 に示す。図 18 及び表 29 に示されるように、1 週間、3 週間、及び 4 週間で、処置した Alb⁺/hu/F9⁻ マウスの血漿中で hFIX を検出し、ELISA では、1 週間、3 週間、及び 4 週間で、 $0.5 \sim 10 \text{ µg/mL}$ の発現値を示す。

【0339】

【表 24】

表 29. ヒト FIX 血漿レベル及び NGS 結果。

試料	1 週目 (µg/mL)	3 週目 (µg/mL)	4 週目 (µg/mL)	インデル 肝臓	インデル 脾臓
S1 PBS	BLD	BLD	BLD	6.12	0.12
S18 AAV8 のみ	BLD	BLD	BLD	0.73	0.10
S2 G000666 のみ	BLD	BLD	BLD	37.48	0.92
S4 G000666 のみ	BLD	BLD	BLD	30.67	1.17
S19 G009860 のみ	BLD	BLD	BLD	12.25	0.31
S20 G009860 のみ	BLD	BLD	BLD	10.73	0.45
S10 CAG	42.60	129.83	117.74	1.45	0.12
S14 CAG	35.55	82.25	100.95	0.08	0.11
S15 CAG	37.30	115.51	107.26	0.10	0.05
S16 CAG	36.39	81.27	116.24	0.05	0.10
S17 CAG	40.50	101.38	124.15	0.16	0.06
S5 AAV8+G000666	2.90	5.00	8.79	41.46	1.43
S6 AAV8+G000666	4.67	6.11	10.29	33.81	1.59
S7 AAV8+G000666	2.88	3.15	3.01	33.47	1.04
S8 AAV8+G000666	0.94	1.61	試料なし	36.54	1.34
S9 AAV8+G000666	7.14	7.53	7.23	30.63	1.38
S11 AAV8+G009860	0.73	0.62	0.86	11.15	0.52
S12 AAV8+G009860	0.52	0.43	0.47	7.05	0.39
S13 AAV8+G009860	1.71	1.89	0.93	18.38	0.57
S21 AAV8+G009860	1.21	2.79	0.59	13.44	0.22
S22 AAV8+G009860	2.06	1.03	2.37	18.06	0.19
ヒト	4.00	3.91	4.12	該当せず	該当せず

【0340】

残りの肝臓を10%中性緩衝ホルマリン中で24時間固定し、次いで、70%エタノールに移した。別個の葉由来の4~5個の試料を切断し、Histowizに送り、処理され、パラフィンブロックに埋め込まれた。次いで、一般的なBASESCOPE（商標）手順及びAdvanced Cell Diagnosticsによる試薬、ならびに成功した組み込み及び転写が達成されたときにALB^{ms/hu}マウスにおける各それぞれのアルブミン遺伝子座の第1のイントロンからのヒトまたはマウスアルブミンシグナル配列のいずれかと、hF9導入遺伝子との間に形成される固有のmRNA接合部を標的とするカスタム設計プローブを使用して、Ventana Ultra Discovery（Roche）上でのBASESCOPE（商標）を介して、分析のために各パラフィンブロックから5ミクロン切片を切断した。HALOイメージングソフトウェア（Indica Labs）を使用して、各試料中の陽性細胞のパーセンテージを定量化する。

10

【0341】

次に、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）及びトロンビン生成アッセイ（TGA）による機能的凝固活性の評価のために、終末血液を使用した。活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）は、血漿中の固有経路凝固活性の臨床測定である。血漿は、エラグ酸またはカオリンの添加によって凝固するように誘導され、これらの両方は、凝固の固有経路（接触経路として知られる）中の凝固第XII因子を活性化し、その後、トロンビンが活性化されると、フィブリノーゲンからフィブリンの生成をもたらす。aPTTアッセイは、血栓を生成する個体の能力の推定を提供し、この情報は、出血または血栓症のリスクを決定するために使用することができる。aPTTを試験するために、電気機械的血栓検出法（粘度に基づく検出システム）を用いる半自動ベンチトップシステム（Diagnostica Stago STart 4）を使用して、血漿中の凝固を評価した。スチールボールを有する各キュベットに、50μLのクエン酸血漿を添加し、37℃で5分間インキュベートし、次いで、50μLのエラグ酸（最終濃度30μM）を37℃で300秒間添加して凝固を誘発した。各キュベットに50μLの0.025M塩化カルシウム（最終濃度8mM）を添加することによる凝固の最終活性化後、スチールボールは2つの駆動コイル間で前後に振動し始めた。ボールの動きはレシーバーコイルによって検出された。フィブリンの生成は、ボールが動かなくなるまで血漿粘度を増加させ、それを凝固時間として記録した。測定された唯一のパラメータは凝固時間であった。試験を2つ組で実施した。

20

【0342】

トロンビン生成アッセイ（TGA）は、活性化血漿中のトロンビン生成の動態の非臨床的評価である。トロンビン生成は、トロンビンが他の凝固因子の活性化、及びフィブリノーゲンからフィブリンへの変換のための追加のトロンビンの増殖（FXII活性化を介する）を担うため、凝固の不可欠なプロセスである。トロンビン生成アッセイは、トロンビンを生成する個体の能力の推定を提供し、この情報は、出血または血栓症のリスクを決定するために使用することができる。TGAを行うために、自動校正トロンボグラムを使用して、分光光度計（Thrombinograph（商標）、Thermo Scientific）におけるトロンビン生成レベルを評価した。高スループット実験のために、96ウェルプレート（Immulon II HB）を使用した。各ウェルに、55μLのクエン酸血漿（マウス血漿のために生理食塩水で4倍希釈）を添加し、37℃で30分間インキュベートした。トロンビン生成は、15μLの2μMエラグ酸（最終濃度0.33μM）を37℃で45分間添加することによって誘発される。16mMのCaCl₂を含む15μLの蛍光発生基質（FluCa、Thrombinoscope BV）の各ウェルへの自動注射後に、トロンビン生成を決定した。蛍光発生基質は、生成されたトロンビンと反応し、460nmで90分間、33秒毎に血漿中で連続的に測定された。蛍光強度は、トロンビンのタンパク質分解活性に比例した。トレーシングにおいて測定された主なパラメータは、ラグ時間、トロンビン生成のピーク、トロンビン生成のピークまでの時間、及び内因性トロンビン電位（ETP）であった。ラグ時間は、血漿中のトロンビンの初期検出に必要な時間の推定を提供する。ピークは、活性化後の所与の時間に生成されるト

30

40

50

ロンビンの最大量である。トロンビン生成のピークまでの時間は、凝固カスケードの開始からトロンビン生成のピークまでの時間である。E T P は、測定された 6 0 分間に生成されたトロンビンの総量である。試験を 2 つ組で実施した。

【 0 3 4 3 】

図 1 9 及び表 3 0 に示されるように、例えば、G 0 0 0 6 6 6 を使用する h F 9 導入遺伝子の挿入は、a P T T アッセイにおいて回復した凝固機能を示した。A A V のみ及び L N P のみの陰性対照試料は、生理食塩水中で 4 5 ～ 6 0 秒の長時間の a P T T 時間を示した。陽性対照 C A G G 及び試験試料 A A V 8 + L N P は、2 8 ～ 3 4 秒の正常なヒト a P T T により近かった。

【 0 3 4 4 】

【表 2 5】

表 30. aPTT 及び TGA-EA。

試料番号	I.V.注射	4 週目 F9 μg/mL	平均 aPTT (秒)	TGA-EA ピーク (nM)
1	PBS	BLD	40.2	11.13
18	AAV のみ	BLD	62.5	-1
2	LNP g666 のみ	BLD	53.9	-1
4	LNP g666 のみ	BLD	65.0	2.45
19	LNP G009860 のみ	BLD	34.1	42.83
20	LNP G009860 のみ	BLD	56.7	18.07
10	AAV+CAGG F9	117.74	41.1	42.65
14	AAV+CAGG F9	100.95	34.1	49.96
15	AAV+CAGG F9	107.26	42.2	49.49
16	AAV+CAGG F9	116.24	37.9	44.46
17	AAV+CAGG F9	124.15	44.1	38.02
5	AAV+g666	8.79	31.3	72.11
6	AAV+g666	10.29	32.6	90.14
7	AAV+g666	3.01	33.5	58.33
8	AAV+g666	試料なし	該当せず	該当せず
9	AAV+g666	7.23	25.9	67.23
11	AAV+G009860	0.86	36.8	56.92
12	AAV+G009860	0.47	37.7	45.16
13	AAV+G009860	0.93	35.3	60.45
21	AAV+G009860	0.59	36.1	47.44
22	AAV+G009860	2.37	>300	管内の血栓

【 0 3 4 5 】

図 2 0 A、図 2 0 B、及び図 2 1 ならびに表 3 0 に示されるように、例えば、G 0 0 0 6 6 6 を使用する h F 9 導入遺伝子の挿入は、T G A - E A 分析におけるトロンビン生成の増加を示した。陽性対照 C A G G 及び A A V 8 + L N P において、トロンビン濃度は、陰性対照試料と比較してより高かった。

【 0 3 4 6 】

結論として、h F I X は、1 週間、3 週間、及び 4 週間で、A l b + / h u / F 9 - / マウスの血漿中で検出され、発現された h F I X - R 3 3 8 L は、T G A アッセイにおいてトロンビンが生成され、a P T T 凝固時間が改善されたため、機能的であることが見出された。

【 0 3 4 7 】

ヒトアルブミンイントロン 1 : (配列番号 1)

GTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTTTTATTCTATTTTCCCAGTAAAATAA
 AGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTATTTCTAAAATG
 GCATAGTATTTTGTATTTGTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAATTCAA
 ACATCCTAGGTAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCT
 TTTGCGCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAACTTCACAGAA
 TAGGGTTGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATGC
 TTTATTTAAAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAAGTTGTATTT
 ATATTTATTTTCATTTTAGTCTGTCTTCTTGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGA
 GTATTAGATATTATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTAA
 AATAGTATTCTTGGTAATTGAATTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATT
 GAACATCATCCTGAGTTTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTGAAACAAAT
 GCATAATCTAAGTCAAATGGAAAGAAATATAAAAAGTAACATTATTACTTCTTGT
 TTTCTTCAGTATTTAACAATCCTTTTTTTTCTTCCCTTGCCCAG

10

【 0 3 4 8 】

【表 2 6】

表 5. マウスアルブミンガイド RNA

ガイド ID	ガイド配列	マウスゲノム座標 (mm10)	配列 番号
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU	chr5:90461148-90461168	98
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA	chr5:90461590-90461610	99
G000553	GUUACAGGAAAAUCUGAAGG	chr5:90461569-90461589	100
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC	chr5:90461589-90461609	101
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUUAGG	chr5:90461151-90461171	102
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAACA	chr5:90461709-90461729	103
G000667	AUCGUUACAGGAAAAUCUGA	chr5:90461572-90461592	104
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU	chr5:90461601-90461621	105
G000669	CAAUCUUUAAUAUGUUGUG	chr5:90461674-90461694	106
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC	chr5:90461710-90461730	107
G011722	UGCUGUAUUUUUCUAGUAA	chr5:90461039-90461059	108
G011723	GUAAAUACUACUAAGACAA	chr5:90461425-90461445	109
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC	chr5:90461047-90461067	110
G011725	UUAUAUUAUUGAUUAUUUU	chr5:90461174-90461194	111
G011726	GCACAGAUUAUAAACACUUA	chr5:90461480-90461500	112
G011727	CACAGAUUAUAAACACUUA	chr5:90461481-90461501	113
G011728	GGUUUUAAAAUAAUAAUGU	chr5:90461502-90461522	114
G011729	UCAGAUUUUCCUGUACGAU	chr5:90461572-90461592	115
G011730	CAGAUUUUCCUGUACGAUC	chr5:90461573-90461593	116
G011731	CAAUGGUAAAUAAGAAUAA	chr5:90461408-90461428	117
G013018	GGAAAAUCUGAAGGUGGCAA	chr5:90461563-90461583	118
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUG	chr5:90461717-90461737	119

20

30

40

【 0 3 4 9 】

50

【表 27】

表 6. マウスアルブミン sgRNA 及び修飾パターン

ガイド ID	完全配列	配列 番号	修飾された完全配列	配列 番号
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	120	mA*mU*mU*UGCAUCUGAGAACCCUUGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	142
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	121	mA*mU*mC*GGGAACUGGCAUCUUCAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	143
G000553	GUUACAGGAAAAUCUGAAGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	122	mG*mU*mU*ACAGGAAAAUCUGAAGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	144
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	123	mG*mA*mU*CGGGAACUGGCAUCUUCGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	145
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUAGG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	124	mU*mG*mC*AUCUGAGAACCCUAGGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	146
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAACA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	125	mC*mA*mC*UCUUGUCUGUGGAAACAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	147
G000667	AUCGUUACAGGAAAAUCUGA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	126	mA*mU*mC*GUUACAGGAAAAUCUGAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	148
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUACAACUUGAAAAAGU GGCACCAGUCGGUGCUUUU	127	mG*mC*mA*UCUUCAGGGAGUAGCUUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	149

10

20

30

40

ガイド ID	完全配列	配列 番号	修飾された完全配列	配列 番号
G000669	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	128	mC*mA*mA*UCUUUAAAUAUGUUGUGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	150
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	129	mU*mC*mA*CUCUUGUCUGUGGAAACGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	151
G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGUAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	130	mU*mG*mC*UUGUAUUUUUCUAGUAAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	152
G011723	GUAAUAUCUACUAAGACAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	131	mG*mU*mA*AAUAUCUACUAAGACAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	153
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	132	mU*mU*mU*UUCUAGUAAUGGAAGCCGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	154
G011725	UUUAUUAUUGAUUAUUUU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	133	mU*mU*mA*UAUUAUUGAUUAUUUUGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	155
G011726	GCACAGAUAAAACACUUA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	134	mG*mC*mA*CAGAUAAAACACUUAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	156
G011727	CACAGAUAAAACACUUAAC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	135	mC*mA*mC*AGAUAAAACACUUAACGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	157

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列 番号	修飾された完全配列	配列 番号
G011728	GGUUUUAAAAUAAUAAUGU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	136	mG*mG*mU*UUUAAAAUAAUAAUGUGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	158
G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACGAU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	137	mU*mC*mA*GAUUUCCUGUAACGAUGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	159
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGAUC GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	138	mC*mA*mG*AUUUUCCUGUAACGAUCGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	160
G011731	CA AUGGUAAAUAAGAAUAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	139	mC*mA*mA*UGGUAAAUAAGAAUAAUGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	161
G013018	GGAAAAUCUGAAGGUGGCAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	140	mG*mG*mA*AAAUCUGAAGGUGGCAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	162
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	141	mG*mG*mC*GAUCUCACUCUUGUCUGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	163

10

20

30

【 0 3 5 0 】

40

50

【表 2 8】

表 7. カニクイザルアルブミンガイド RNA

ガイド ID	ガイド配列	カニクイザルゲノム座標 (mf5)	配列 番号
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	chr5:61198711-61198731	2
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUCUG	chr5:61198712-61198732	165
G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGGGA	chr5:61198716-61198736	166
G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGGAA	chr5:61198717-61198737	167
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGAAG	chr5:61198718-61198738	168
G009849	GGGGAAGGGGAGAAAAAAA	chr5:61198731-61198751	169
G009850	GGGAAGGGGAGAAAAAAA	chr5:61198732-61198752	170
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAU	chr5:61198825-61198845	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAUAUU	chr5:61198826-61198846	172
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAGUC	chr5:61198852-61198872	4
G009854	UACAGAAAAGUCAGGAUAA	chr5:61198859-61198879	174
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAAACAG	chr5:61198889-61198909	175
G009856	UUAUAGUUUUAUAUCAAAC	chr5:61198957-61198977	176
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	chr5:61199062-61199082	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	chr5:61199070-61199090	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	chr5:61199096-61199116	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	chr5:61199101-61199121	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	chr5:61199108-61199128	9
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUA	chr5:61199109-61199129	182
G009863	UUACUUUGCACUUUCCUUAG	chr5:61199186-61199206	183
G009864	UACUUUGCACUUUCCUUAGU	chr5:61199187-61199207	184
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCU	chr5:61199238-61199258	185
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	chr5:61199367-61199387	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAA	chr5:61199401-61199421	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAA	chr5:61198812-61198832	12
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCUGU	chr5:61198860-61198880	189
G009870	UGAAUUAUUCUCUGUUUAA	chr5:61198901-61198921	190
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCCACUA	chr5:61199203-61199223	191
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUUUAG	chr5:61199229-61199249	192
G009873	AACAUCUAGGUAAAAUAAA	chr5:61199246-61199266	193
G009874	UAAUAAAAUCAAACAUCU	chr5:61199258-61199278	13
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAU	chr5:61199322-61199342	195
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAA	chr5:61199323-61199343	196

10

20

30

40

【 0 3 5 1】

50

【表 29】

表 8. カニクイザル sgRNA 及び修飾パターン

ガイド ID	完全配列	配列番号	修飾された完全配列	配列番号
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACCUCACUCUUGUCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	66
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUCUG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	198	mA*mG*mC*AACCUCACUCUUGUCUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	231
G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGGGA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	199	mA*mC*mC*UCACUCUUGUCUGGGGAGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	232
G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGGA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	200	mC*mC*mU*CACUCUUGUCUGGGGAAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	233
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGAAG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	201	mC*mU*mC*ACUCUUGUCUGGGGAAGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	234
G009849	GGGAAGGGGAGAAAAAAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	202	mG*mG*mG*GAAGGGGAGAAAAAAAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	235
G009850	GGGAAGGGGAGAAAAAAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	203	mG*mG*mG*AAGGGGAGAAAAAAAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	236
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUUGUUUCAAUAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	67

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列 番号	修飾された完全配列	配列 番号
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUUU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUGUUUCAAAAUUUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	68
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAAGUC GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	206	mU*mG*mA*UUCCUACAGAAAAAGUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	239
G009854	UACAGAAAAAGUCAGGAUAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	207	mU*mA*mC*AGAAAAAGUCAGGAUAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	240
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAAACAG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	208	mU*mU*mU*CUUCUGCCUUUAAACAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	241
G009856	UUAUAGUUUUAUUAUCAAAC GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	209	mU*mU*mA*UAGUUUUAUUAUCAAACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	242
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	37	mA*mU*mU*UAUGAGAUCAACAGCACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	69
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	38	mG*mA*mU*CAACAGCACAGGUUUUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	70
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGCAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	39	mU*mU*mA*AAUAAAGCAUAGUGCAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	71

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列 番号	修飾された完全配列	配列 番号
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	40	mU*mA*mA*AGCAUAGUGCAAUGGAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	72
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAAUGGAUAGGUCUUUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	73
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	215	mA*mG*mU*GCAAUGGAUAGGUCUUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	248
G009863	UUACUUUGCACUUUCCUUAG GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	216	mU*mU*mA*CUUUGCACUUUCCUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	249
G009864	UACUUUGCACUUUCCUUAGU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	217	mU*mA*mC*UUUGCACUUUCCUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	250
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUACCU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	218	mU*mC*mU*GACCUUUUAUUUUACCUUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	251
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAACUUUAUUUUACUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	74
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA GUUUUAGAGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGAACAAUAGAAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU	75

10

20

30

40

50

ガイド ID	完全配列	配列番号	修飾された完全配列	配列番号
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	44	mA *mA *mU *GCAUAAUCUAAGUCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	76
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCUGU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	222	mA *mU *mU *AUCCUGACUUUUUCUGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	255
G009870	UGAAUUAUCCUCUGUUUAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	223	mU *mG *mA *AUUAUCCUCUGUUUAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	256
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCACUA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	224	mU *mA *mA *UUUUCUUUUGCCACUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	257
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUUUAG GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	225	mA *mA *mA *AGGUCAGAAUUGUUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	258
G009873	AACAUCCUAGGUAAAAUAAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	226	mA *mA *mC *AUCCUAGGUAAAAUAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	259
G009874	UAAUAAAAUCAAACAUCU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	45	mU *mA *mA *UAAAAUCAAACAUCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	77
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAAAU GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	228	mU *mU *mG *UCAUGUAUUUCUAAAAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	261

10

20

30

40

ガイド ID	完全配列	配列番号	修飾された完全配列	配列番号
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAAAA GUUUUAGAGCUAGAAUAGC AAGUUAUUUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU	229	mU *mU *mU *GUCAUGUAUUUCUAAAAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU *mU *mU *mU	262

50

【 0 3 5 2 】

【表 3 0】

表 9. ベクター成分及び配列

プラスミド ID	5'ITR	第 1 の配向			第 2 の配向			3'ITR
		スプライスアクセプター	導入遺伝子	ポリ A	ポリ A	導入遺伝子	スプライスアクセプター	
P00147	(配列番号 263)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 264)	ヒト第 IX 因子(R338L)(配列番号 265)	配列番号 266	配列番号 267	ヒト第 IX 因子(R338L)(配列番号 268)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 269)	(配列番号 270)
P00411	(配列番号 263)	ヒト第 IX 因子スプライスアクセプター(配列番号 271)	ヒト第 IX 因子(R338L)-HiBit(配列番号 272)	配列番号 266	配列番号 267	ヒト第 IX 因子(R338L)-HiBit(配列番号 273)	ヒト第 IX 因子スプライスアクセプター(配列番号 274)	(配列番号 270)
P00415	(配列番号 263)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 264)	Nluc-P2A-GFP(配列番号 275)	配列番号 266	配列番号 267	Nluc-P2A-GFP(配列番号 276)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 269)	(配列番号 270)
P00418	(配列番号 263)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 264)	ヒト第 IX 因子(R338L)-HiBit(配列番号 272)	配列番号 266	配列番号 267	ヒト第 IX 因子(R338L)-HiBit(配列番号 273)	マウスアルブミンスプライスアクセプター(配列番号 269)	(配列番号 270)

10

20

【 0 3 5 3 】

5' ITR 配列 (配列番号 2 6 3) :

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT

30

【 0 3 5 4 】

マウスアルブミンスプライスアクセプター (第 1 の配向) (配列番号 2 6 4) :

TAGGTCAGTGAAGAGAAGAACAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCAT
CAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAG

【 0 3 5 5 】

ヒト第 IX 因子 (R 3 3 8 L) 、第 1 の配向 (配列番号 2 6 5) :

40

50

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATT
CAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAG
AAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTGAAAACACTGAAAGAACAA
CTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTT
AAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTT
GGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGC
AGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTA
CTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCAT
TTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGAC
TGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATA
ACATCACTCAAAGCACCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTGTGGTGGAGA
AGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTGTGTTTGAATGGTAAAGTTGAT
GCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCTGCCACT
GTGTTGAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTGCGCAGGTGAACATAATATTGAGGA
GACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAATTATTCCTCACCACAA
CTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGAC
GAACCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAAT
ACACGAACATCTTCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAAGTGGCTGGGGAAGAGT
CTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTT
GACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCT
GTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGAC
CCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGG
TGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTA
TGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTAA

10

20

【0356】

ポリA（第1の配向）（配列番号266）：

CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAA
TTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG
TGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGGTATC
CCC

30

【0357】

ポリA（第2の配向）（配列番号267）：

AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAA
CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTG

【0358】

ヒト第IX因子（R338L）、第2の配向（配列番号268）：

TTAGGTGAGCTTAGTCTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTAT
AGATGCCATATTTCCCCTTCATCGCACATTCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTC
AAGAACTTGTTCTTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGC
ATGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGT
AAATTTCTGTGGACAGAAGACAGGTGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATA
TTGCAGAACGAGGGCTGATCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCCACCCTCAC
ATATCCGCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATACAAA
TCGGGGTAACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTA
TATCATGGTTGTACTTGTTTATAGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTG

40

50

ATAACATTCCTTTTCTGTTTCAGTATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGC
CACGACCGTAATCTTAACCCCGTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCAC
TTTTCAATTGACTATGGAGCCCCACAAAACGCGTCGACTTTTCCGTTGAGCACCA
CCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCTCGCCCCGACAACCCTAGTAAA
GTCATTAAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGGCTTCAG
TAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAACTTTGA
TGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGTTTCACAGCT
CTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACCTTTGTTG
TCGGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTAAATGTTGCAGGTGAC
GTCCAACTCGCAGTTTTTTTCTTCAAAAACCAAAAGGGCACCAACACTCGTAGGAA
TTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTTCAGACATGGATTAGATTTCGATTGGTC
CCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAAACACCT
CGCGCGCTTCTTCAAACTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTTCCCT
TGCACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATCTT
ATTCGCGTTTTCTGTTGCCAGAAA

10

【0359】

マウスアルブミンスプライスアクセプター（第2の配向）（配列番号269）：

CTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCAACACAACATATTTAAAGATTGATGAAGAC
AACTAACTGTAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTTCACTGACCTA

20

【0360】

3' ITR 配列（配列番号270）：

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC
TGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

【0361】

ヒト第IX因子スプライスアクセプター（第1の配向）（配列番号271）：

GATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGTAAAATTTTCATGATG
TTTTCTTTTTTGCTAAAACTAAAGAATTATTCCTTTTACATTTTCAG

30

【0362】

ヒト第IX因子（R338L）- HiBit（第1の配向）（配列番号272）：

40

50

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATT
CAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAG
AAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAA
CTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTT
AAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTT
GGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGC
AGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTA
CTGAGGGATATCGACTTGCAAGAAAACCAGAAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCAT
TTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGAC
TGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATA
ACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGA
AGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGAT
GCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAACGCTGCCCCACT
GTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTGCGCAGGTGAACATAATATTGAGGA
GACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACAA
CTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACCTGGAC
GAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAAT
ACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGT
CTTCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTT
GACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCT

10

GTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGAC
CCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGG
TGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTCTCCCGGTA
TGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTGTCAGCGGATGGAGACTGTT
CAAGAAGATCAGCTAA

20

【 0 3 6 3 】

ヒト第ⅠX因子（R338L）－H i B i t（第2の配向）（配列番号273）：

TTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGCCGCTCACGGTGAGCTTAGTCTTTTTCT
TTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCATATTTCCCCTTCAT
CGCACATTCTCCCCCACTTATTATCCCGGTCAAGAACTTGTTCTTCGACTT
CAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCGCGACCGCCCTCGTG
AAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTCTGTGGACAGAAGACA
GGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAACGAGGGCTGATCG
ACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCACCCACTCACATATCCGCTCCCAAATTTCAAG
AAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATACAAATCGGGGTAACATAGGAGTTAA
GTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGGTTGTAATTGTTTAT
AGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATTCCTTTTCTGTTTCT
TATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCGTAATCTTAACCCCC
GTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCC
CACAAAACGCGTCGACTTTTCCGTTGAGCACCACTGCCATGGAAATTGGCCAGG
TTTAGCGTCTCGCCCCGACAACCCTAGTAAAGTCATTAAATGACTGTGTGGAT
TGTTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGGCTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACAT
CGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAACTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCG
ACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTTCACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCG
GTAGCCCTCAGTGCAACTACACAACTTTGTTGTGCGCGGAATTTTACAGAAT
TGCTCGCATCGTCCATTTTAAATGTTGCAGGTGACGTCCAACCTCGCAGTTTTTCC
TTCAAAAACCAAAGGGCACCAACACTCGTAGGAATTTATATCGTCTTTACAACCT
CCCCCATTCAGACATGGATTAGATTCGCATTGGTCCCATCGACATATTGCTTCC
AGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAAACACCTCGCGCGCTTCTTCAAACT
GCATTTTCTCCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTTCCTTGCACGAATCTTCAAGCT
TTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATCTTATTCGCGTTTTCTGTGGTCC
AGAAA

30

40

50

【0364】

ヒト第IX因子スプライスアクセプター（第2の配向）（配列番号274）：

CTGAAATGTAAAAGAATAATTCTTTAGTTTTAGCAAAAAAGAAAACATCATGAA
AATTTTACATCTCTTAAGAAAGTCTTTGTTTTTAATCCAAATAATC

【0365】

N l u c - P 2 A - G F P（第1の配向）（配列番号275）：

TTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATT
CAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAG
AAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCAGTATTCAC TTTGGAGGACTTTGTCTGGTGACTG
GAGGCAAACCGCTGGTTATAATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAA
TTCCCTCTTTCAGAAATTTGGGTGTAAGCGTCACACCAATCCAGCGGATTGTGTTG
TCTGGAGAGAACGGACTCAAAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTC
TCAGTGGAGACCAAATGGGGCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAG
TCGACGATCACCAC TTTCAAAGTCAATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGG
AGTAACTCCTAATATGATTGATTACTTTGGTTCGCCCCGTATGAGGGCATCGCAGTG
TTTGATGGCAAAAAGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATA
ATCGACGAGAGATTGATAAATCCAGACGGGTCACTCCTGTT CAGGGTTACAATTA
ACGGCGTCACAGGATGGAGACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTCTACT

10

CCTGAAGCAGGCCGGAGACGTGGAGGAAAACCCAGGGCCCCGTGAGCAAGGGCG
AGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCCAC
CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC
ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG
CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
TTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
GAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAAC
GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCC
AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGG
AGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAG
GAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAA

20

30

【0366】

N l u c - P 2 A - G F P（第2の配向）（配列番号276）：

40

50

TTACACCTTCCTCTTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
CCAGGGTGATGCCGGCGGCGGTACGAACTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTT
CTCGTTGGGGTCCTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGC
AGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGC
TGCACGCTGCCGTCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTT
CTTCTGCTTGTTCGGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCT
TGTGGCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCT
GTTACACAGGGTGTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCG
TCGTCCTTGAAGAAGATGGTCCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCT
TGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCC
GTAGGTACAGGGTGGTCACCAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGT
GCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCG
CTCACGCTGAACTTGTGGCCGTTACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCA
CCACGCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCCTCCAC
GTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGC
CTCCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTCACCCTGAACAGCAGGCTGCCGTGGGGT
TGATCAGCCTCTCGTCGATGATCTTGTGTCGCTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGT
GATCTTCTTGCCGTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCG
ATCATGTTGGGGGTACGCCGTCGATCACCAGGGTGCCGTAGTGCAGGATCACCT
TGAAGTGGTGGTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGAAAATCTTCTCGATCTGGCC
CATCTGGTCGCCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTC
AGGCCGTTCTCGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTACGCTCACGCCCA
GGTTCTGGAACAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTA
GCCGGCGGTCTGCCTCCAGTCGCCACGAAGTCCTCCAGGGTGAACACGGCCTCC
TCGAAGCTGCACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACTC
CTCCAGCTTGCCGCTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTACAGGATCTTGTGGCGTTCT
CGTGGTCCAGGAA

10

20

【 0 3 6 7 】

P 0 0 1 4 7 完全配列（ I T R から I T R ）：（ 配列番号 2 7 7 ）

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTTAGGTCAGTG

30

40

50

AAGAGAAGAAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAA
TATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGC
CAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTT
TGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGA
AGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTA
TGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAG
GATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACT
GTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTA
AAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGC
AGAAAACCAGAAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTC
TGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCCTGATGTGGACT
ATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCA
ATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAA
TTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTAT
CGTTAATGAAAAATGGATTGTAACCTGCTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGTTAAA
ATTACAGTTGTGCGAGGTGAACATAATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAA
AAGCGAAATGTGATTGCAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATA
AGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACCTGGACGAACCCCTAGTGCTAAACAG
CTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAA
TTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCA
GCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCT
ATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGA
GGTAGAGATTTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAA
GGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAA
GGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAA
AAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTT
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCT
GGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCT
GGGGCTCTAGGGGGTATCCCCAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAA
ACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTT
ACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCA
TTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTAGGTGA
GCTTAGTCTTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCGTATAGATGCCA
TATTTCCCCCTTCATCGCACATTCTCCCCCAACTTATTATCCCGGTCAAGAACT
TGTTCCCTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTTGGCATGAGTCG
CGACCGCCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAATCGTAAATTTTCG
TGGACAGAAGACAGGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCAAATATTGCAGAA
CGAGGGCTGATCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCCACCCTCACATATCCGCT
CCCAAATTTCAAGAAGATATTTGTATATTCCTTATCGGCTATACAAATCGGGGT
ACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGGGCTATATCATGG
TTGACTTGTTTATAGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATGATCCTGATAACATT
CCTTTCTGTTCAGTATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCGCCAGCCACGACCG
TAATCTTAACCCCGTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAATCCACTTTTCAATTG
ACTATGGAGCCCCCACAACCGCGTCGACTTTTCCGTTGAGCACCACCTGCCATG
GAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCTCGCCCCGACAACCCTAGTAAAGTCATTTAA
TGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGGCTTCAGTAGAGTTA
ACGTAGTCCACATCGGGAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAACTTTGATGTCTGGG
ACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGTTTACAGCTCTTTTGATT

10

20

30

40

50

CTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACTTTGTTGTCGGCGGAA
TTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTTAATGTTGCAGGTGACGTCCAACCTC
GCAGTTTTTTTCCTTCAAAACCAAAAGGGCACCAACACTCGTAGGAATTTATATCG
TCTTTACAACCTCCCCCATTCAGACATGGATTAGATTTCGCATTGGTCCCCATCGA
CATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAAACACCTCGCGCGCT
TCTTCAAAACTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGTTCCCTTGCACGAA
TTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGTATCTTATTCGCGT
TTTCGTGGTCCAGAAAACTGTGGAAACAGGGAGAGAAAAACCACACAACATAT
TTAAAGATTGATGAAGACAACCTAAGTAAATATGCTGCTTTTTGTTCTTCTCTTCA
CTGACCTAAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT
TTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

10

【 0 3 6 8 】

P 0 0 4 1 1 完全配列 (I T R から I T R) : (配列番号 2 7 8)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTGATTATTTGGA
TTAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGTAAAATTTTCATGATGTTTTCTTTTTTG
CTAAAACTAAAGAATTATTCTTTTACATTTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCC
AACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTT
GTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAA
GCACGAGAAGTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTAT
GTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGG
ATGACATTAATTCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTG
TGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAA
AAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGTCTCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCA
GAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCT
GTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTCTGATGTGGACTA
TGTAATTTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAA
TCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAAT
TCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATC
GTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAA
TTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAA
AGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACTACAATGCAGCTATTAATAA
GTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGC
TACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCTCAAAT
TTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAG
CTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTA
TCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAG
GTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAG
GGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAG
GCAAATATGGAATATATACCAAGGTCTCCCGGTATGTCAACTGGATTAAAGGAAA
AAACAAAGCTCACTGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAACCTC
GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTC
TGACCTTGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGC
ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC
AGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG
CTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCA
AAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTG
TTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC

20

30

40

50

AAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC
TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGCC
GCTCACGGTGAGCTTAGTCTTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTCG
TATAGATGCCATATTTCCCTTCATCGCACATTCTCCCCCAACTTATTATCCCG
GTCAAGAACTTGTTCCCTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCTT
GGCATGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAAA
TCGTAAATTTTCGTGGACAGAAGACAGGTCGCTCTATCGACCAACGGGACGCGCA
AATATTGCAGAACGAGGGCTGATCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCACCCAC
TCACATATCCGCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTATA
CAAATCGGGGTAACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAGG
GCTATATCATGGTTGTACTTGTTTATAGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATGAT
CCTGATAACATTCCCTTTTCTGTTCAAGTATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTCCGC
AGCCACGACCGTAATCTTAACCCCGTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAATC
CACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCCAAAAACGCGTCGACTTTTCCGTTGAGCA
CCACCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCTCGCCCCGACAACCTAGT
AAAGTCATTAAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGGCT
TCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAACT
TTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTTTAC
AGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACCTT
GTTGTGCGCGGAATTTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTAAATGTTGCAGG
TGACGTCCAACTCGCAGTTTTTCTTCAAAAACCAAAAGGGCACCAACACTCGTA
GGAATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTACAGACATGGATTAGATTTCGATT
GGTCCCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCAA
CACCTCGCGCGCTTCTTCAAAACTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAAGT
TCCCTTGACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAAGT
ATCTTATTCGCGTTTTCTGTGGTCCAGAAAACTGAAATGTAAAAGAATAATTCTT
TAGTTTTAGCAAAAAAGAAAACATCATGAAAATTTTACATCTCTTAAGAAAGTCT
TTGTTTTTAATCCAAATAATCAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCC
ACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGC
GTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
GAGTGGCCAA

10

20

【 0 3 6 9 】

30

P 0 0 4 1 5 完全配列 (I T R から I T R) : (配列番号 2 7 9)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCTAGATCTCTTAGGTCACTG
AAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAA
TATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGC
CAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTT
TGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGA
AGCAGTATTCACTTTGGAGGACTTTGTGCGGTGACTGGAGGCAAACCGCTGGTTAT
AATCTCGACCAAGTACTGGAACAGGGCGGGGTAAGTTCCCTCTTTCAGAATTTGG
GTGTAAGCGTCACACCAATCCAGCGGATTGTGTTGTCTGGAGAGAACGGACTCA
AAATTGACATCCATGTTATCATTCCATATGAAGGTCTCAGTGGAGACCAAATGGG
GCAGATCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATCACCATTCAAA
GTCATTCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGGAGTAACTCCTAATATGATTG
ATTACTTTGGTCGCCCCGTATGAGGGCATCGCAGTGTGTTGATGGCAAAAAGATCAC
CGTAACAGGAACGTTGTGGAATGGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTGATAAA
TCCAGACGGGTCCTCTGTTTCAAGGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATGGAG
ACTCTGTGAACGAATACTGGCCACAAATTTTTCACTCCTGAAGCAGGCCGGAGAC

40

50

GTGGAGGAAAACCCAGGGCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGT
GGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGT
GTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACC
TACGGCGTGCAAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCT
TCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGT
GAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
GCACAAGCTGGAGTACAATAACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG
CAGCGTGCAAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCC
CGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGA
AGAGAAAGGTCTAACCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC
CCCTCCCCCGTGCCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTA
ATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGG
GGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGG
CTTAGGGGGTATCCCCAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATA
AAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGACAGTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTA
GTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTACACCTTCCTC
TTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCAGGGTGATGC
CGGCGGCGGTACGAACCTCCAGCAGCACCATGTGGTCCCTCTTCTCGTTGGGGTC
CTTGCTCAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGG
GCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGCTGCACGCTGCCG
TCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGT
GGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCAGG
ATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCTGTTACACAGGGT
GTCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAG
AAGATGGTCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCTTGAAGAAGTCGT
GCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTACAGGT
GGTACACAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCTGGTGGTGCAGATGAAGT
CAGGGTCAGCTTGCCTGAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCGCTCACGCTGAAC
TTGTGGCCGTTACGCTCGCCGTCAGCTCCAGGATGGGCACCAAGCCGGTGA
ACAGCTCCTCGCCCTTGTCTACGGGGGCCGGGGTTCTCCTCCACGTCGCCGGCCTG
CTTACAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGGATCCTCTCGCACAGCTCCAGCCGGTC
ACGCCGTTGATGGTACCCCTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGATCAGCCTCT
CGTCGATGATCTTGTGCGGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGTGATCTTCTTGCC
GTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCTGCCGAAGTAGTCGATCATGTTGGG
GGTCACGCCGTCGATCACAGGGTGCCGTAGTGCAGGATCACCTTGAAGTGGTG
GTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGAAGTCTTCTCGATCTGGCCCATCTGGTCG
CCGCTCAGGCCCTCGTAGGGGATGATCACGTGGATGTCGATCTTCAGGCCGTTCT
CGCCGCTCAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTACGCTCACGCCAGGTTCTGGAA
CAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTTGTAGCCGGCGGTC
TGCCTCCAGTCGCCACGAAGTCTCCAGGGTGAACACGGCCTCCTCGAAGCTGC
ACTTCTCCTCCATGCACTCCCTCTCCAGGTTGCCCTGCACGAACCTCCTCAGCTTG
CCGTGTTGTACCTCTTGGGCCTGTTACAGGATCTTGTGGCGTTCTCGTGGTCCAG
GAA

10

20

30

40

【 0 3 7 0 】

P 0 0 4 1 8 完全配列 (I T R から I T R) : (配列番号 2 8 0)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTCTTAGGTCAGTG
AAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAA
TATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGC
CAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTT
TGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGA
AGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTA
TGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAG
GATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACT
GTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTA
AAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGC
AGAAAACCAGAAGTCCGTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTC
TGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACT
ATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCA
ATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAA
TTCCCTTGGCAGGTGTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTAT
CGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTGTGCTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGTAAAA
ATTACAGTTGTGCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAA
AAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACTACAATGCAGCTATTAATA
AGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAG
CTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCTCATAA
TTTGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCA
GCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCT
ATCTACAAAGTTCCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGA
GGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGA
GGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAA
GGCAAATATGGAATATATACCAAGGTCTCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAA
AAAACAAAGCTCACTGTCAGCGGATGGAGACTGTTCAAGAAGATCAGCTAACCT
CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTG
CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGG
GCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCC
AAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTT
GTTGTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
CAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGCCAAA
CTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTTAGGAAATCTTCTTAAACAGCCGCCAGC
CGCTCACGGTGAGCTTAGTCTTTTCTTTTATCCAATTCACGTAGCGAGAGACCTTC
GTATAGATGCCATATTTCCCCTTCATCGCACATTCTCCCCCACTTATTATCCC
GGTCAAGAACTTGTTCCCTTCGACTTCAGTGACGTGTGGTCCACCTGAATCACCT
TGGCATGAGTCGCGACCGCCCTCGTGAAACCCAGCACAAAACATGTTATTGTAA
ATCGTAAATTTTCGTGGACAGAAGACAGGTCTGCTCTATCGACCAACGGGACGCGC
AAATATTGCAGAACGAGGGCTGATCGACCTTTGTGGAAGACCCGCCCCACCCA
CTCATATCCGCTCCCAAATTTCAAGAAGATATTTGTATATTCTTTATCGGCTAT
ACAAATCGGGGTAAACATAGGAGTTAAGTACGAGTGGCTCGTCCAGCTCCAGGAG
GGCTATATCATGGTTGTACTTGTTTATAGCGGCATTATAATTGTGATGGGGTATG
ATCCTGATAACATTCCTTTTCTGTTTCAGTATGCTCAGTTTCTTCAATGTTGTGTTTCG

10

20

30

40

50

CCAGCCACGACCGTAATCTTAACCCCCGTCTCGACACAGTGTGCGGCCGTTACAA
TCCACTTTTCATTGACTATGGAGCCCCACAAAACGCGTCGACTTTTCCGTTGAG
CACCACCTGCCATGGAAATTGGCCAGGTTTAGCGTCCTCGCCCCGACAACCCTA
GTAAAGTCATTAAATGACTGTGTGGATTGTGTTATATTATCAAGAATCGTTTCGG
CTTCAGTAGAGTTAACGTAGTCCACATCGGGAAAAACTGTCTCGGCCCTTGTCAA
CTTTGATGTCTGGGACACACTTACCCGACCGCACGGGAAGGGCACCGCCGGTTC
ACAGCTCTTTTGATTCTCAGCGAGCCGGTAGCCCTCAGTGCAACTACACACAACT
TTGTTGTCGGCGGAATTTTACAGAATTGCTCGCATCGTCCATTTTAAATGTTGCA
GGTGACGTCCAACCTCGCAGTTTTTCTTCAAAAACCAAAGGGCACCAACACTCG
TAGGAATTTATATCGTCTTTACAACCTCCCCCATTTCAGACATGGATTAGATTTCG
ATTGGTCCCCATCGACATATTGCTTCCAGAACTCAGTGGTCCGTTCTGTATTCTCA
AACACCTCGCGCGCTTCTTCAAAAACCTGCATTTTTCTCCATACACTCTCGCTCCAA
GTTCCCTTGCACGAATTCTTCAAGCTTTCCTGAGTTATACCTTTTAGGCCGGTTAA
GTATCTTATTTCGCGTTTTCTGTTGCCAGAAAACTGTGGAAACAGGGAGAGAAA
AACCACACAACATATTTAAAGATTGATGAAGACAACCTAACTGTAATATGCTGCTT
TTTGTCTTCTCTTCACTGACCTAAGAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCGGGCAAAGCCCCG
GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAG
AGGGAGTGGCCAA

10

【 0 3 7 1 】

20

P 0 0 1 2 3 完全配列 (I T R から I T R) : (配列番号 2 8 1)

GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC
GCCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGGAGGGGTGGAGTCGTGATA
GGTCAGTGAAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCA
ATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCA
TGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATT
GGAAGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAG
TTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTG
GAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGC
AGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTGGAAG
GAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGC
AGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATA
TCGACTTGCAGAAAACCAGAAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGG
AAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGT
ATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCA
AAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAA
CCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTG
GAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCACTGTGTTGAAAC
TGGTGTAAATACAGTTGTTCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACA
TACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATTCCTCACCACAACCTACAATGC
AGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAACCTGGACGAACCCTTA
GTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACA
TCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAA
AGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCC
ACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTT
CCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTAC
TGAAGTGGAAAGGGACCAAGTTTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTG
TGCAATGAAAGGCAAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTG
GATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC

30

40

50

CATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC
ACTGTCCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTC
ATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAA
GAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACTAGTCCACTCCCTCTCTGCGCGC
TCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGC
CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA

【0372】

P00204完全配列（ITRからITR）：（配列番号282）

GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTC
GCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGA
GAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGGAGGGGTGGAGTCGTGACC
TAGGTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCCAGGGGTGTGTTTCGCCGAGAAGCACGTA
AGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTTGTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTA
TTTTAAAATAGTTAAATTTTCTTTAGTGCTGATTTCTAGATTATTACTGTTGT
TGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATCTGAGAACTAGGTCAGTGAAGAGAAGAA
CAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGT
GGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAAT
TCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTC AAGG
GAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGA
AGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGG
AGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATT
AATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAG
ATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTG
CTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCA
GAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAA
ACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTC
TACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAAT
GACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGC
AGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGA
AAAATGGATTGTAAGTCTGCCACTGTGTTGAACTGGTGTAAATTAACAGTT
GTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAAGCGAAA
TGTGATTGCAATTATTCCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAAC
CATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTA
CACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATC
TGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTT
CTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAA
GTTACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGAT
TCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGT
TTCTTAACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATAT
GGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAG
CTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCC
CCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAA
ATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGG
GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTG
GGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTA
GGGGGTATCCCCCTTAGGTGGTTATATTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGA
CAATAATGGGGGATTTTGAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAATTAATAAAAAA
TGCTAGGCAGAATGACTCAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTC
ATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATACTAAAAATTAAAGTGTACTAGTCCA

10

20

30

40

50

CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC
ACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
A

【0373】

P00353 完全配列 (ITR から ITR) : (配列番号 283)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTGATTTTGAAGCT
TAGCTTTAAATTTCTTTTAAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACTCAAATTA
CGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTCGACCATG
CTATACTAAAAATTAAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTTTCCATTTA
TATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAACATGACA
GAAACACTAAATCTTGAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACGGGTTTAA
AAATAATAATGTTGGTGAAAAAATATACTTTGAGTGTAGCAGAGAGGAACCAT
TGCCACCTTCAGATTTTCTGTAAACGATCGGGAAGTGGCATCTTCAGGGAGTAGC
TTAGGTCAGTGAAGAGAAGAACAAGCAGCATATTACAGTTAGTTGTCTTCA
TCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGTTTTTCTTGA
TCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTTTCTTGATCATGA
AAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGAGGTATAATTCAGGTAAATTGGA
AGAGTTTGTTCAAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTT
TGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAGAACAACTGAATTTTGGA
GCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGT
TGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAA
AGAAGTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGT
TTTGTAATAATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCG
ACTTGACAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCAGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAG
AGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTGATG
TGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAG
CACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCA
GGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAG
GCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCCACTGTGTTGAACTGG
TGTTAAATTAACAGTTGTTCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATAC
AGAGCAAAAGCGAAATGTGATTCGAATTATTCCTCACCACAACATCAATGCAGC
TATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCCCTTAGTG
CTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCT
TCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGG
GAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCCACTTGTTGACCGAGCCACA
TGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCA
TGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGA
AGTGGAAAGGACCAGTTTCTTAAGTGAATTAATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGC
AATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGTCAACTGGAT
TAAGGAAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
CTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT
CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC
AATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGA
ACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATT
TGGGAGAACAAACATTTCAAAGGCCTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAA
TATTTCTGGTAGTATTAGTTAAAGTTTTTAAACACCTTTTCCACCTTGAGTGTGA
GAATTGTAGAGCAGTGCTGTCCAGTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGT

10

20

30

40

50

GGATCTGTGCTGAGCAATGTGGCAGCCAGAGATCACAAGGCTATCAAGCACTTT
GCACATGGCAAGTGTAAGTGAAGACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATT
GAATGTATCTAGCCATGTGTGGCTAGTAGCTCCTTTCCTGGAGAGAGAATCTGGA
GCCCACATCTAACTTGTTAAGTCTGGAATCTTATTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTA
TGAAGTATAGTTTTTGGGGGCAGCTCACTTACTAACTTTTAATGCAATAAGAATCT
CATGGTATCTTGAGAACATTATTTTGTCTCTTTGTAGATCTAGGAACCCCTAGTGA
TGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGGC
AAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC
GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

10

【 0 3 7 4 】

P 0 0 3 5 4 完全配列（ I T R から I T R ）：（ 配列番号 2 8 4 ）

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTTAGATCTTAGCCTCTGGCA
AAATGAAGTGGGTAACCTTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCC
AGGGGTGTGTTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTT
GTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGT
GCTGATTTCTAGATTATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATC
TGAGAACCCCTTAGGTGGTTATATTATTGATATATTTTTTGGTATCTTTGATGACAAT
AATGGGGGATTTTGAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAATTAATAAAAAAATGCT
AGGCAGAATGACTCAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAG
GGCCTGCCTGCTCGACCATGCTATACTAAAAATTAAGTGTGTGTTACTAATTT
TATAAATGGAGTTTCCATTTATATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGT
AGATATTTACAAACATGACAGAAACACTAAATCCTTGAGTTTGAATGCACAGATAT
AAACACTTAACGGGTTTTTAAAAATAAATGTTGGTGAAAAAATATACTTTGAG
TGTAGCAGAGAGGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCTGTAAACGATCGGGAACCT
GGCATCTTCAGGGAGTAGCTTAGGTGAGTGAAGAGAAGAACAATAAGCAGCATA
TTACAGTTAGTTGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTG
TTTCCACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAA
GAGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGGAACCTTGAGAGAGA
ATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACAC
TGAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTC
CAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGT
TGGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACA
TTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGG
TTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACC
AGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACC
CGTGCTGAGACTGTTTTTCTGTATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAA
CCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGT
TGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAAT
GGTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAA
CTGCTGCCCACTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAATTACAGTTGTTCGAGGTGAACA
TAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTAT
TCCTCACCACAACATAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTT
CTGGAAGTGGACGAACCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTG
CTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGG
CTGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGA
GTTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTACCATCTATAA
CAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGAT
AGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAAGTGAATT

20

30

40

50

ATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAG
GTATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGA
CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTG
ACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAG
CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGGCT
CTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCGTG
AGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACAAACATTTCAAAGGCCTGTAAG
TTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTTCTGGTAGTATTAGTTAAAGTTTTAAA
ACACCTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAAATTGTAGAGCAGTGCTGTCCAGTAGAAA
TGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTGCTGAGCAATGTGGCAGCCAGA
GATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAAGTGTAAGTGAAGACACAC
ATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGCCATGTGTGGCTAGTAGC
TCCTTTCCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCACATCTAACTTGTTAAGTCTGGAATC
TTATTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGGGGCAGCTCACTTA
CTAACTTTTAATGCAATAAGAATCTCATGGTATCTTGAGAACATTATTTTGTCTCT
TTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTAAGTCACAT
CTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAATGAGTAATTAATTTATTTTT
AGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCCAAATAACAGAGGTATATGGTTAGAAAAG
AAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAATTTAGAG
AGTAGTTTGCTGTTTGCTCATGTTTATAAATCTATTGACACATATGTGCATCTG
CACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGT
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCC
CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
AGAGGGAGTGGCCAA

10

20

【 0 3 7 5 】

P 0 0 3 5 0 : 3 0 0 / 6 0 0 b p の H A F 9 構 築 物 (G 5 5 1 に つ い て) (配 列 番 号
2 8 5)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTAAGTATATTAGA
GCGAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCA
AAATGAAGTGGGTAACCTTTCCTCCTCCTCTTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCC
AGGGGTGTGTTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTT
GTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGT
GCTGATTTCTAGATTATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATC
TGAGAACCTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAG
AGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAA
TGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACT
GAAAGAACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCC
AATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTT
GGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACAT
TAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGT
TTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCA
GCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCAAACTTCTAAGCTCACCC
GTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAAC
CATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTT
GTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATG
GTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAC
TGCTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACAT
AATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATT

30

40

50

CCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTC
TGGAACCTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGC
TGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGC
TGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAG
TTCCACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTTACCCTCTATAAC
AACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTTCATGTCAAGGAGATA
GTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACCTGGAATTAT
TAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGT
ATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAACAAAGCTCACTTAACCTCGACT
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
ATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAG
GTGGTTATATTATTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTT
GAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACT
CAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTC
GACCATGCTATACTAAAAATTAAAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTT
TCCATTTATATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAA
CATGACAGAAACACTAAAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCGCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCG
GCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAA

10

20

【0376】

P00356:300/2000bpのHA F9構築物(G551について)(配列番号286)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTTAGATCTAAGTATATTAGA
GCGAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCTCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCA
AAATGAAGTGGGTAACCTTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCC
AGGGGTGTGTTTTGCGCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTT
GTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGT
GCTGATTTCTAGATTATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCATTATTTGCATC
TGAGAACCTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAG
AGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAA
TGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACT
GAAAGAACAACCTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCC
AATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTT
GGTGTCCCTTTGGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACAT
TAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTTGTAATAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGT
TTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCA
GCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCC
GTGCTGAGACTGTTTTTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAAC
CATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTT
GTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATG
GTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAC
TGCTGCCCCTGTGTTGAACTGGTGTAAAATTACAGTTGTGCGCAGGTGAACAT
AATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAATTATT
CCTCACCACAACACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTC
TGGAACCTGGACGAACCCCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGC

30

40

50

TGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGC
TGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAG
TTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAAC
AACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATA
GTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTAT
TAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGT
ATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAAGGAAAAAACAAGCTCACTTAACTCGACT
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCTTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
ATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAG
GTGGTTATATTATGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTT
GAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACT
CAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTC
GACCATGCTATACTAAAAATTAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTT
TCCATTTATATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTTGCTTAGTAGATATTTACAAA
CATGACAGAAACACTAAATCTTGAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACG
GGTTTTAAAAATAATATGTTGGTGAAAAAATAAATTTGAGTGAGCAGAGA
GGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCTGTAAACGATCGGGAAGTGGCATCTTCAG
GGAGTAGCTTAGGTGAGTGAAGAGAAGAACAAGCAGCATATTACAGTTAGT
TGTCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGAC
AAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACAACATTTCAAAGGC
CTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTTCTGGTAGTATTAGTTAAAG
TTTTAAACACCTTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGTAGAGCAGTGCTGTCCA
GTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTGCTGAGCAATGTGGC
AGCCAGAGATCACAAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAAGTGTAAGTGA
AGCACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGCCATGTGTGGC
TAGTAGCTCCTTTCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCACATCTAACTTGTTAAGTC
TGGAATCTTATTTTTTATTTCTGGAAAGGTCTATGAACTATAGTTTTGGGGGCAGC
TCACTTACTAACTTTTAATGCAATAAGATCCATGGTATCTTGAGAACATTATTTG
TCTCTTTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTAAGT
CACATCTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAATGAGTAATTAATTT
ATTTTTAGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCCAAATAACAGAGGTATATGGTTAG
AAAAGAAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAAT
TTAGAGAGTAGTTTGCCTGTTTGCCTCATGTTTATAAATCTATTGACACATATGTG
CATCTGCACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCCTTTGCTTGGAAGGCAGGTG
TTCCCATTAACGCTCAGAGAATAGCTGACGGGAAGAGGCTTTCTAGATAGTTGTA
TGAAAGATATACAAAATCTCGCAGGTATACACAGGCATGATTTGCTGGTTGGGA
GAGCCACTTGCCTCATACTGAGGTTTTTGTGTCTGCTTTTCAGAGTCTGATTGCC
TTTTCCAGTATCTCCAGAAATGCTCATAACGATGAGCATGCCAAATTAGTGCAGG
AAGTAACAGACTTTGCAAAGACGTGTGTTGCCGATGAGTCTGCCGCCAACTGTG
ACAAATCCCTTGTGAGTACCTTCTGATTTTGTGGATCTACTTTCCTGCTTTCTGGA
ACTCTGTTTCAAAGCCAATCATGACTCCATCACTTAAGGCCCGGGAACACTGTG
GCAGAGGGCAGCAGAGAGATTGATAAAGCCAGGGTGATGGGAATTTTCTGTGGG
ACTCCATTTCATAGTAATTGCAGAAAGCTACAATACACTCAAAAAGTCTCACCACA
TGACTGCCCCAAATGGGAGCTTGACAGTGACAGTGACAGTAGATATGCCAAAGTG
GATGAGGGAAAGACCACAAGAGCTAAACCCTGTAAAAAGAACTGTAGGCAACT
AAGGAATGCAGAGAGAAAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGG

10

20

30

40

GCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAA

【0377】

P00362:300/1500bpのHA F9構築物(G551について)(配列番
号287)

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTAGATCTAAGTATATTAGA
GCGAGTCTTTCTGCACACAGATCACCTTTCCTATCAACCCCACTAGCCTCTGGCA
AAATGAAGTGGGTAACTTTCTCCTCCTCCTCTTCGTCTCCGGCTCTGCTTTTTCC
AGGGGTGTGTTTTCGCCGAGAAGCACGTAAGAGTTTTATGTTTTTTCATCTCTGCTT
GTATTTTTCTAGTAATGGAAGCCTGGTATTTTAAAAATAGTTAAATTTTCCTTTAGT
GCTGATTTCTAGATTATTATTACTGTTGTTGTTGTTATTATTGTCAATTATTTGCATC
TGAGAACCTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAG
AGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAA
TGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTTTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGAAAACACT
GAAAGAACAACCTGAATTTTGGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAGTGTGAGTCC
AATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTT
GGTGTCCCTTTGGATTGGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACAT
TAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAATAGTGCTGATAACAAGGTGGT
TTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACCA
GCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCC
GTGCTGAGACTGTTTTCTCTGATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAAC
CATTTTGATAACATCACTCAAAGCACCAATCATTTAATGACTTCACTCGGGTT
GTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTGTTTTGAATG
GTAAAGTTGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAC
TGCTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGTTAAAAATTACAGTTGTTCGAGGTGAACAT
AATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTTCGAATTATT
CCTCACCACAACCTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTC
TGGAACCTGGACGAACCTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGC
TGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGATCTGGCTATGTAAGTGGC
TGGGGAAGAGTCTTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAG
TTCCACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCTATCTACAAAGTTCACCATCTATAAC
AACATGTTCTGTGCTGGCTTCCATGAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATA
GTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACCAGTTTCTTAACTGGAATTAT
TAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGT
ATCCCGGTATGTCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTTAACCTCGACT
GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCTTGC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCG
CATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA
AGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCT
ATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCCTTAG
GTGGTTATATTATTGATATATTTTTGGTATCTTTGATGACAATAATGGGGGATTTT
GAAAGCTTAGCTTTAAATTTCTTTTAAATTAATAAAAAAATGCTAGGCAGAATGACT
CAAATTACGTTGGATACAGTTGAATTTATTACGGTCTCATAGGGCCTGCCTGCTC
GACCATGCTATACTAAAAATTAAAAGTGTGTGTTACTAATTTTATAAATGGAGTT
TCCATTTATATTTACCTTTATTTCTTATTTACCATTGTCTTAGTAGATATTTACAAA
CATGACAGAAACACTAAATCTTGAGTTTGAATGCACAGATATAAACACTTAACG
GGTTTTTAAAAATAATAATGTTGGTGAAAAAATATAACTTTGAGTGTAGCAGAGA
GGAACCATTGCCACCTTCAGATTTTCCTGTAACGATCGGGAACCTGGCATCTTCAG
GGAGTAGCTTAGGTCAGTGAAGAGAAGAACAAAAAGCAGCATATTACAGTTAGT

10

20

30

40

50

TGCTTCATCAATCTTTAAATATGTTGTGTGGTTTTTCTCTCCCTGTTTCCACAGAC
AAGAGTGAGATCGCCCATCGGTATAATGATTTGGGAGAACAACATTTCAAAGGC
CTGTAAGTTATAATGCTGAAAGCCCACTTAATATTTCTGGTAGTATTAGTTAAAG
TTTTAAACACCTTTTTCCACCTTGAGTGTGAGAATTGTAGAGCAGTGCTGTCCA
GTAGAAATGTGTGCATTGACAGAAAGACTGTGGATCTGTGCTGAGCAATGTGGC
AGCCAGAGATCACAAGGCTATCAAGCACTTTGCACATGGCAAGTGTAAGTGAAGA
AGCACACATTCAAATAATAGTTAATTTTAATTGAATGTATCTAGCCATGTGTGGC
TAGTAGCTCCTTTTCTGGAGAGAGAATCTGGAGCCCACATCTAAGTTGTTAAGTC
TGGAATCTTATTTTTTATTTCTGGAAGGTCTATGAACTATAGTTTTTGGGGGCAGC
TCACTTACTAAGTTTAAATGCAATAAGATCCATGGTATCTTGAGAACATTATTTTG
TCTCTTTGTAGTACTGAAACCTTATACATGTGAAGTAAGGGGTCTATACTTAAGT
CACATCTCCAACCTTAGTAATGTTTTAATGTAGTAAAAAAATGAGTAATTAATTT
ATTTTTAGAAGGTCAATAGTATCATGTATTCCAAATAACAGAGGTATATGGTTAG
AAAAGAAACAATTCAAAGGACTTATATAATATCTAGCCTTGACAATGAATAAAT
TTAGAGAGTAGTTTGCCTGTTTGCCTCATGTTTATAAATCTATTGACACATATGTG
CATCTGCACTTCAGCATGGTAGAAGTCCATATTCCTTTGCTTGGAAGGCAGGTG
TTCCCATACGCCTCAGAGAATAGCTGACGGGAAGAGGCTTTCTAGATAGTTGTA
TGAAAGATATACAAAATCTCGCAGGTATACACAGGCATGATTTGCTGGTTGGGA
GAGCCACTTAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCG
CGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTT
TGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

10

20

【0378】

P00147でコードされる第IX因子R338Lポリペプチド（配列番号702）

YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGS
CKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQK
SCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGED
AKPGQFPWQVVLNGKVDAFCCGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQK
RNVIRIIPHHNYNAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWG
RVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTE
VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIEKTKLT

【0379】

Cas9 ORF（配列番号703）

ATGGATAAGAACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGTGGGTTGG
GCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCTGGGG
AACACCGATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC
TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGACGCTAC
ACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATG
GCAAAGGTGCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGG
AGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGG
CGTACCACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACT
CAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATATGATCAA
ATTCCGCGGACACTTCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTG
GATAAGCTTTTCAATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTTCGAAGAAAACC
CAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCCGGCTGTGCGAA
GTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACG
GACTTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCC
AATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGAC
GACGACTTGGAACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTTCC

30

40

50

TTGCCGCTAAGAACCTTTTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAA
CACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGA
GCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGA
AAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACAT
CGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTGGA
AAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCT
CCGGAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGG
TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGAC
AACCAGGAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGC
CCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGAGGAA
ACCATCACTCCTTGGAATTTTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACA
AGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTG
CTTCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACAACGAAGTACTA
AAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGGAGAAC
AGAAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCA
AGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGA
TCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCT
GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCT
GGAAGATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGA
GAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAAACACTCAA
GCGCCGCGGTACACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATT
CGCGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCG
CTAATCGTAACCTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGA
CATCCAAAAGCACAAGTGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGC
GAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGT
GGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAAATATCGTGAT
TGAAATGGCCCGAGAAAACCAAGACTACCCAGAAAGGGCCAGAAAAACTCCCGCG
AAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTG
AAAGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTAC
TATTTGCAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGG
TTGTCTGATTACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACT
CGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTCAGATA
ATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCC
TGAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGC
GCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTTCATCAAACGGCAGCTGGTCG
AGACTCGGCAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGAATCCCGCATGAACA
CTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATTACCTGA
AAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTTCGGAAGGACTTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGA
AATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCCGTACC
GCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTAC
AAGGTCTACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAA
AGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACCTTTTTCAAGACTGAA
ATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGA
GAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAAA
GTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGC
GGATTTTCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCA
CGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGATTCCGCCGACTGTC
GCATATCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAAGAGCAAAAAGCTC
AAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTTCGAG
AAGAACCCGATTGATTTCTCGAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGAT

10

20

30

40

CTGATCATCAAACCTCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCCGGAAGC
GCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTA
GCAAGTACGTCAACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTC
ACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATTATCT
GGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGAC
GCCAACCTCGACAAAGTCTGTGCGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATC
AGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTCAACCCTGACTAACCTGGGAGCC
CCAGCCGCCTTCAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGAAAAGATAACACGTCCA
CCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACTCTACG
AAACTAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGAT

50

【0380】

U - d e p C a s 9 O R F (配列番号 704)

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATG
GGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGG
AAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCTGA
CAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAT
ACACAAGAAGAAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAA
TGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTCTGGTCG
AAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAA
GTGCGATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTC
GACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATG
ATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGC
GACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAA
GAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAG
ACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGA
AGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGA
ACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGG
ACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACG
CAGACCTGTTCTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA
TCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCA
AGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGAC
AGCAGCTGCCGGAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGAT
ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTTCATCA
AGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGAGTCAAGCTGAAC
AGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCA
CCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTA
CCCGTTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAT
CCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGAC
AAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAATTCGAAGAAGTCGTCGACA
AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACAACTTCGACAAGAAC
CTGCCGAACGAAAAGGTCTCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACA
GTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCC
GGCATTCTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGAC
AAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG
AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC
TGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTCTGGACA
ACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCG
AAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGAC
GACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACT
GAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCC
TGGACTTCTCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCC
ACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGA
CAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCCGCAATC
AAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATG
GGAAGACACAAGCCGGAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGAC
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAA
GGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACAC
ACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACAT
GTACGTCGACCAGGAAGTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCA
CATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCTCTGAC

10

20

30

40

50

AAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCG
TCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACAC
AGAGAAAGTTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTG
GACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA
GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG
ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG
ACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACC
ACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGT
ACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCTGCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCA
GAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTAC
TTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG
GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATC
GTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCG
CAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTGAGCAAGGA
AAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACT
GGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCC
TGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAG
GAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATC
GACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG
CTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCA
AGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGT
CAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGA
CAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTCGAACAGCACACAAGCACTACCTGGACGAAAT
CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCT
GGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAAC
AGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG
CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGG
AAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAA
GAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAG
AGAAAGGTCTAG

10

20

【 0 3 8 1 】**U d e p C a s 9 (配 列 番 号 7 0 5) を 含 む m R N A**

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGUUGC
AGGCCUUAUUCGGAUCCGCCACCAUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGAC
AUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCC
GAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAG
AACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG
ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGC
UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCU
CCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGA
CACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCC
GACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUAAGUUCAGAGGACACUUC
CUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAU
CCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAA
GCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAG
ACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUC
GGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAACUU

30

40

50

CGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACG
ACCUUGGACAACCUUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUCCUG
GCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCA
CACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACG
AACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCG
GAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAU
ACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUAUCAAGCCGAUC
CUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAG
ACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGCAUCCCGCACCAGAUC
CACCUGGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUU
CCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCG
UACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAA
GAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAAGUCGUCGACAA
GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACC
UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACA
GUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAAGC
CGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAG
ACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGA
UCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCA
AGCCUGGGAAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCU
GGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACAC
UGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCU
GUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGG
GGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAA
AGACAAUCCUGGACUUCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUAUG
CAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUUAAGGAAGACAUCAGAAAGGCACA
GGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAA
GCCCCGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAACUG
GUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAA
GAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAA
GAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACAC
CCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCA
GAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGC
GACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAU
CGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC
GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGC
UGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGA
GAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUG
GUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAU
GAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUC
ACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAA
GGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG
UCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAAGCGAAUUCGUC
UACGGAGACUACAAGGUCAACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAAC
AGGAAAUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUAUGAA
CUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGC
UGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGA
CUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGA
AGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAG
AAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUAC

10

20

30

40

50

GGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGU
CGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUC
ACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUCCUGGAAGC
AAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUAC
AGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAG
AACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUG
UACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACA
GAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAAC
AGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG
GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGA
AAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUC
AGUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGU
CCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAA
UCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAG
AAAGGUCUAGCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUA
AGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCU
GGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAACAUAUUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCU
CCUCUUCUUCUUCUGUCUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

10

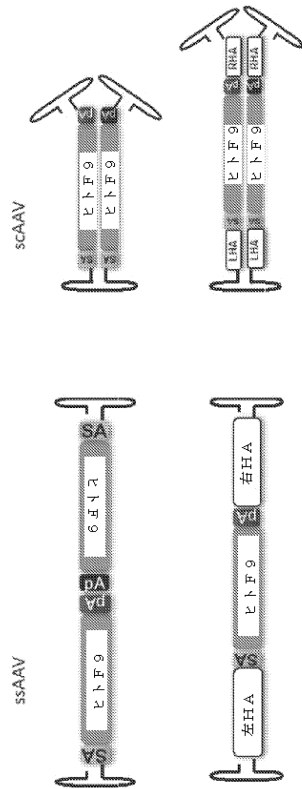
20

30

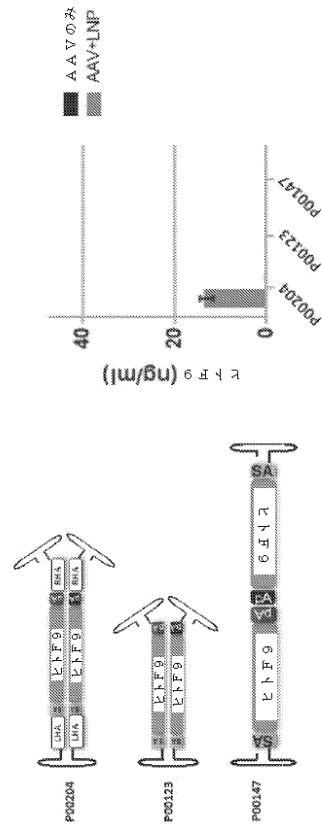
40

50

【図面】
【図 1】



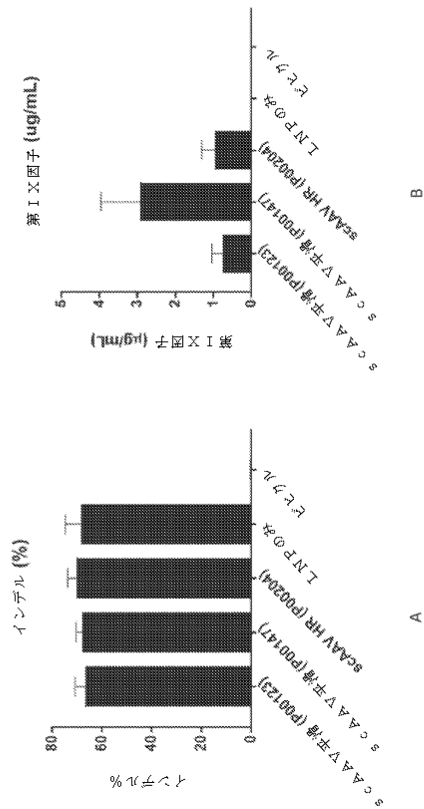
【図 2】



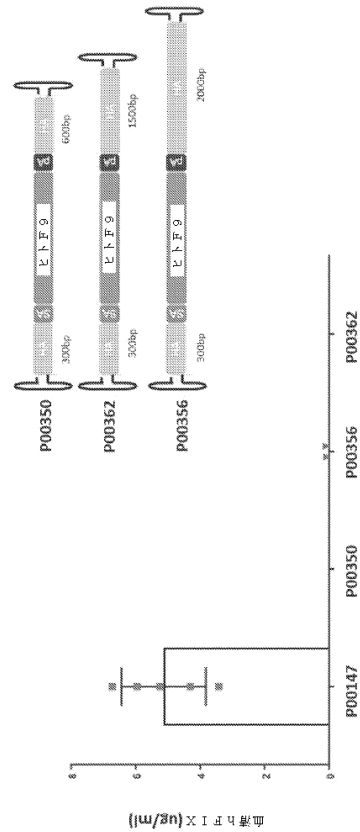
10

20

【図 3】



【図 4 A】

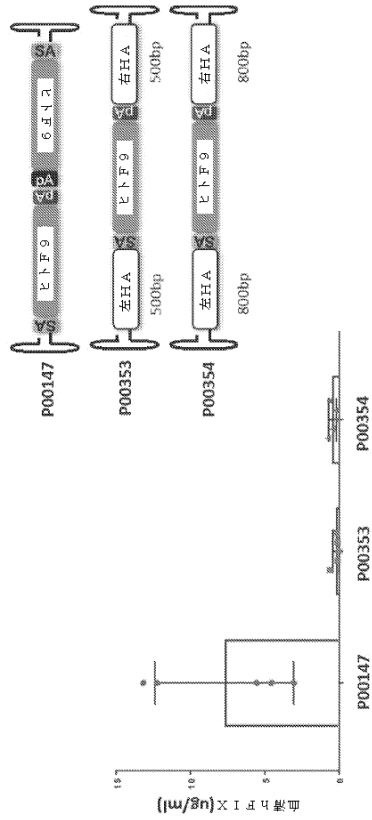


30

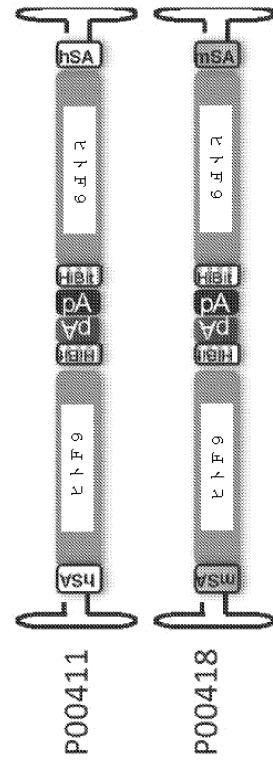
40

50

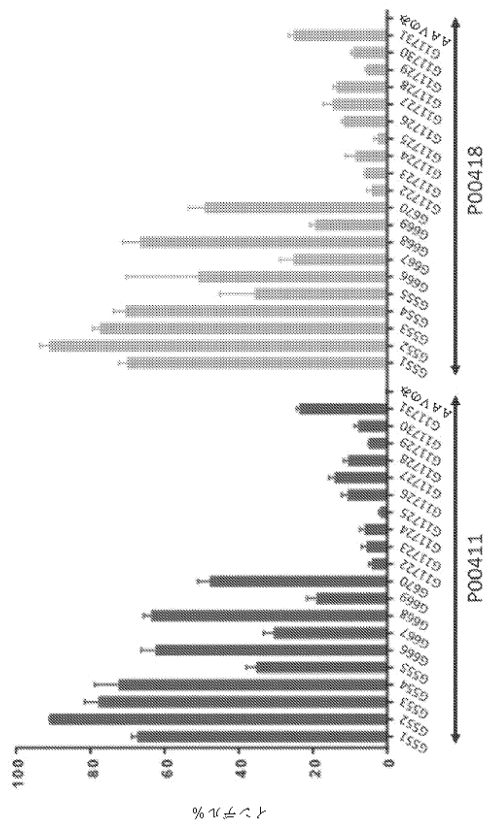
【図 4 B】



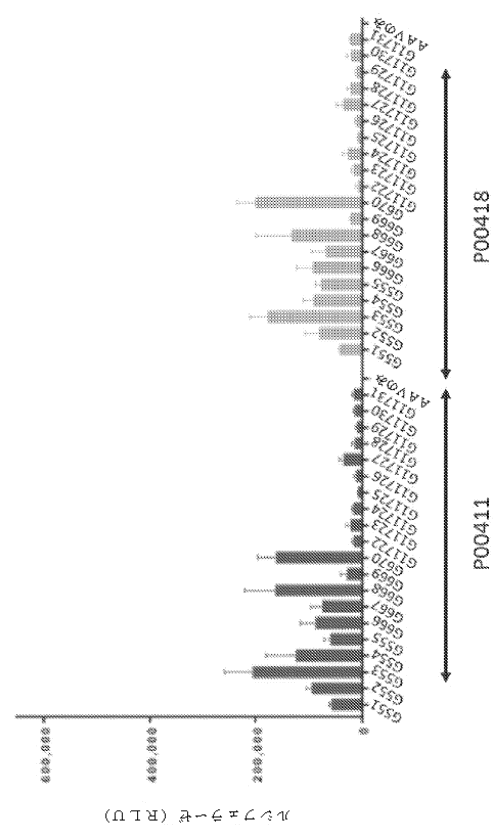
【図 5 A】



【図 5 B】



【図 5 C】



10

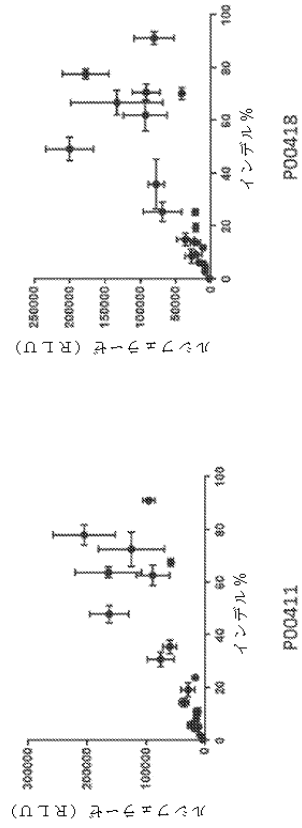
20

30

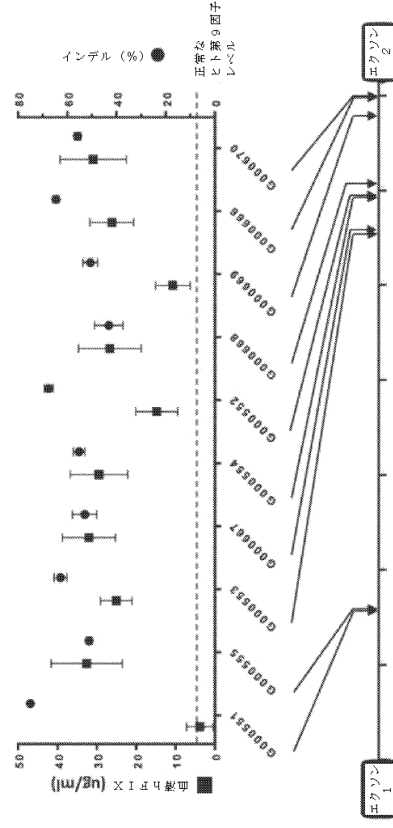
40

50

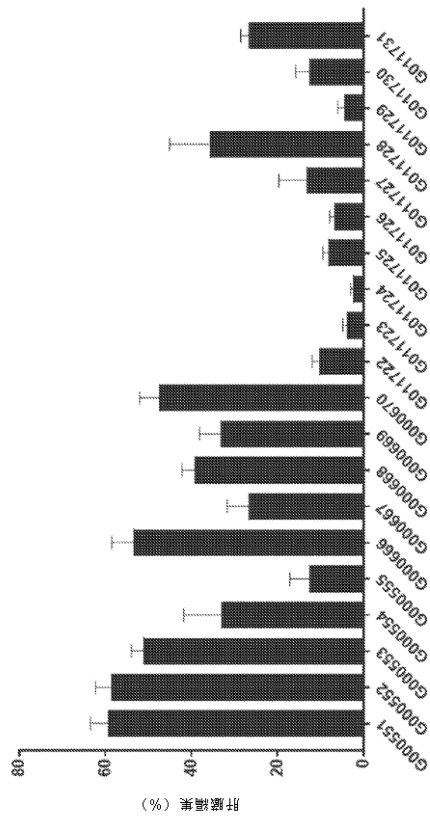
【図 5 D】



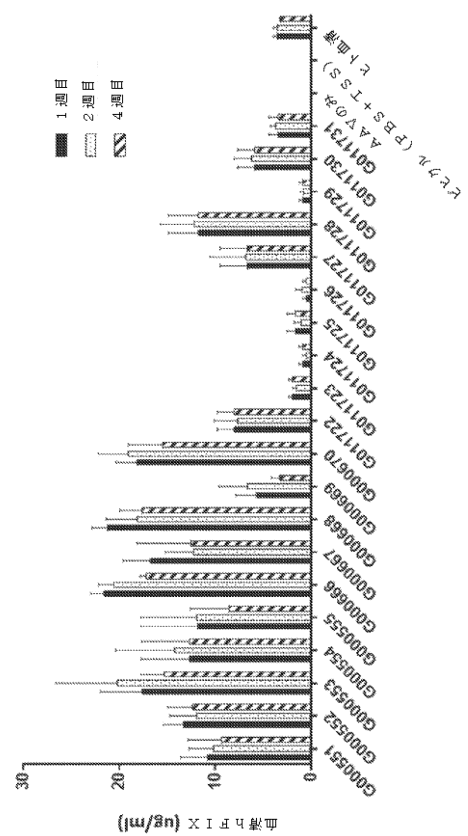
【図 6】



【図 7 A】



【図 7 B】



10

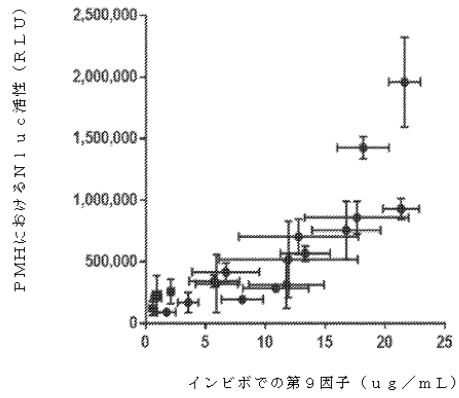
20

30

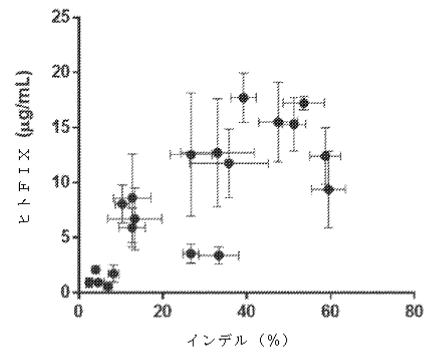
40

50

【図 7 C】

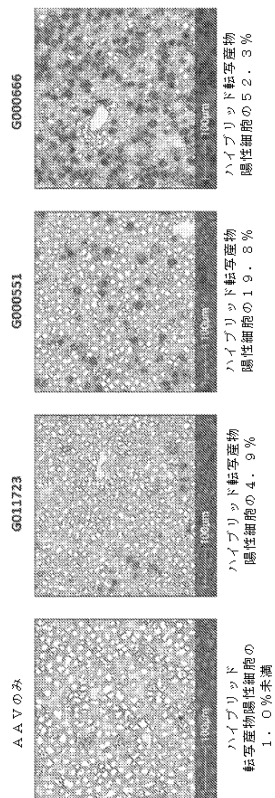


【図 7 D】

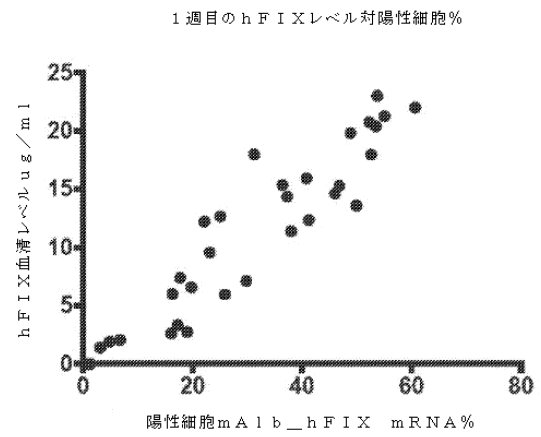


10

【図 8 A】



【図 8 B】



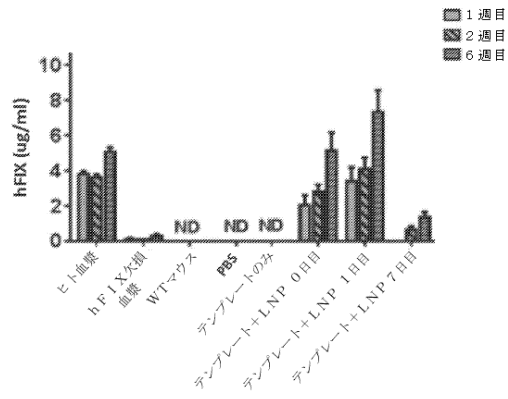
20

30

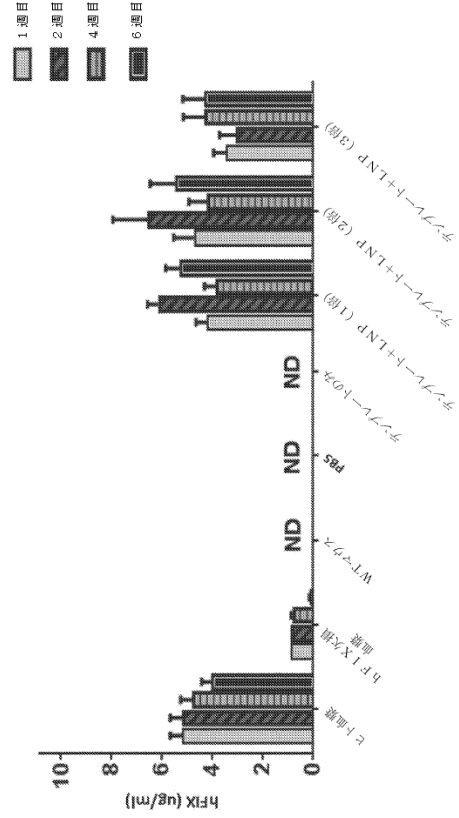
40

50

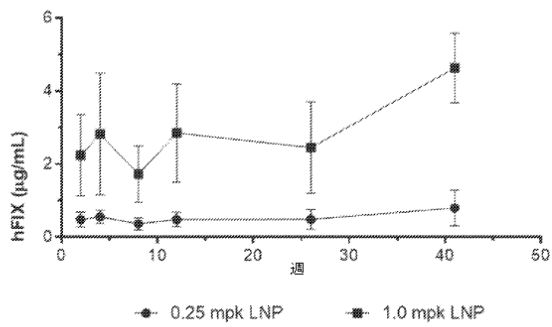
【図 9】



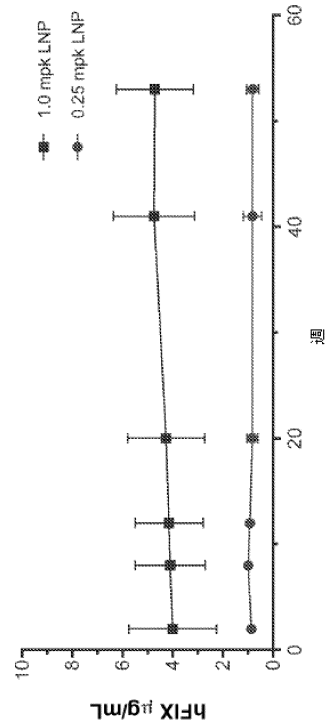
【図 10】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

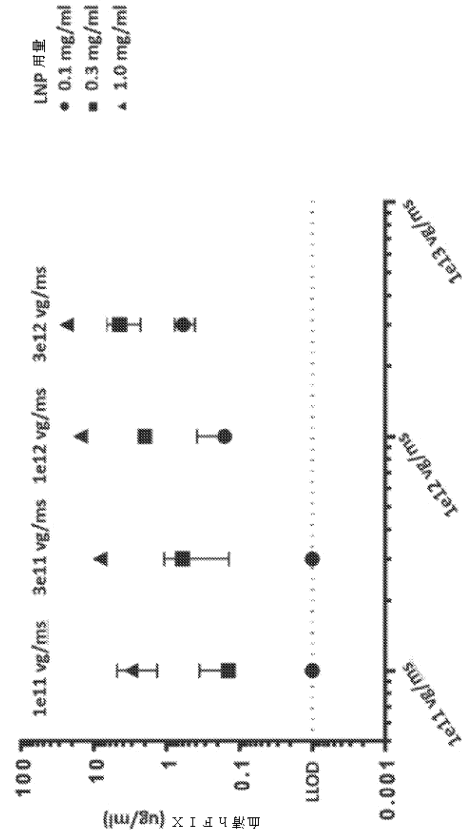
20

30

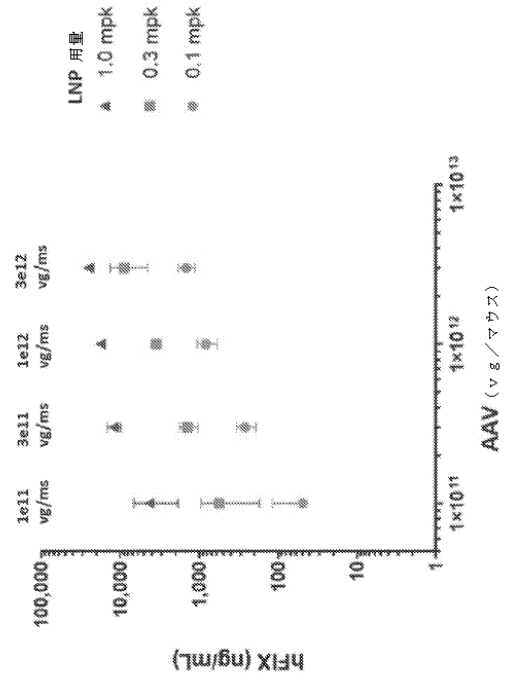
40

50

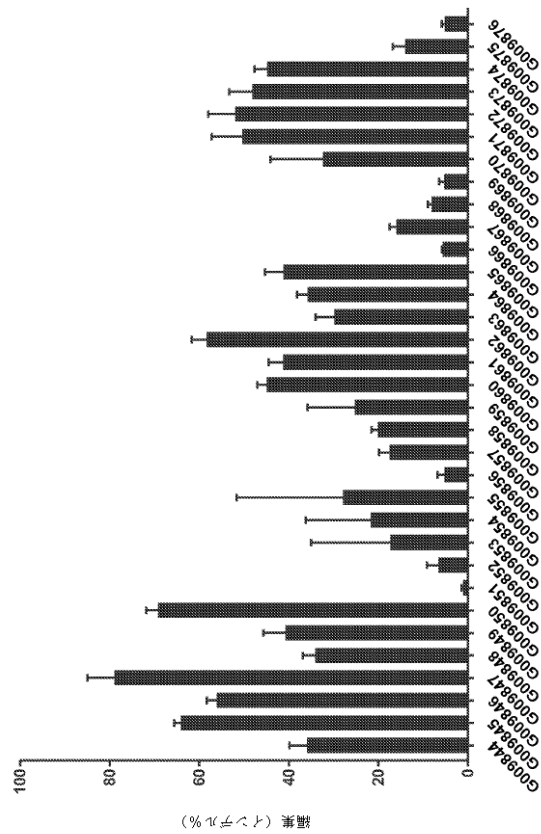
【図 1 2 A】



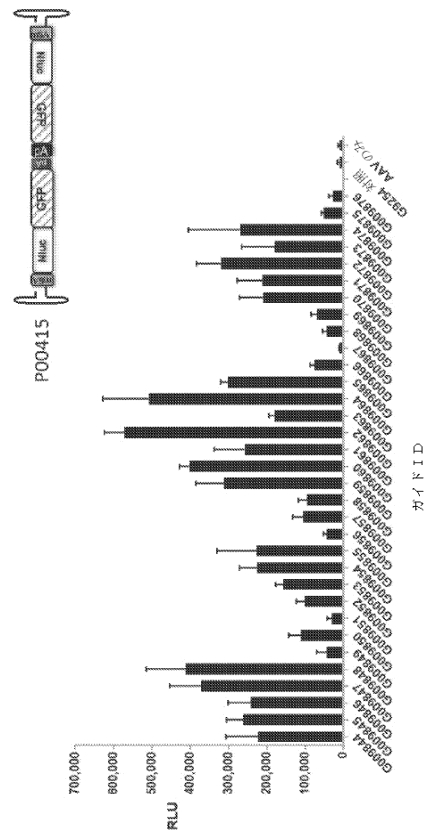
【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

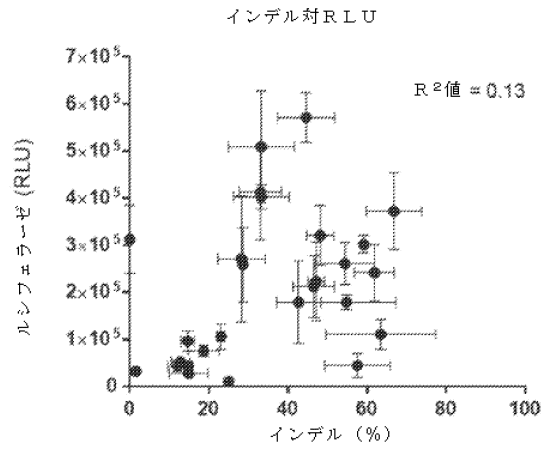
20

30

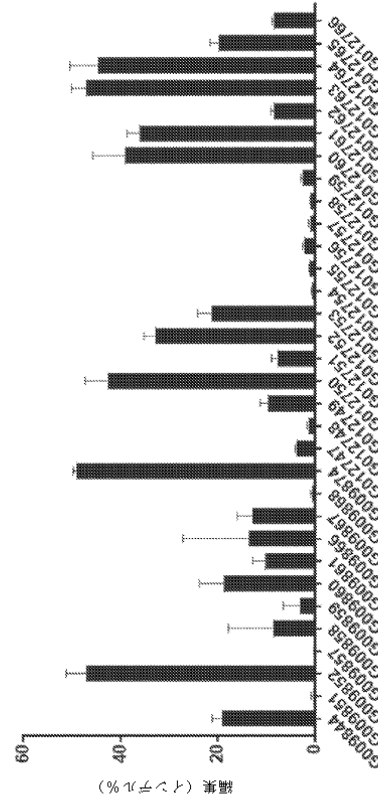
40

50

【図 1 3 C】



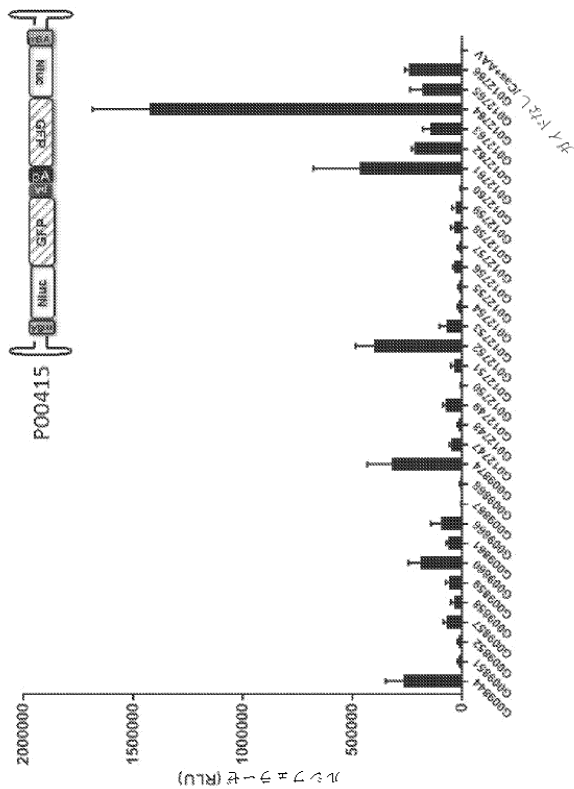
【図 1 4 A】



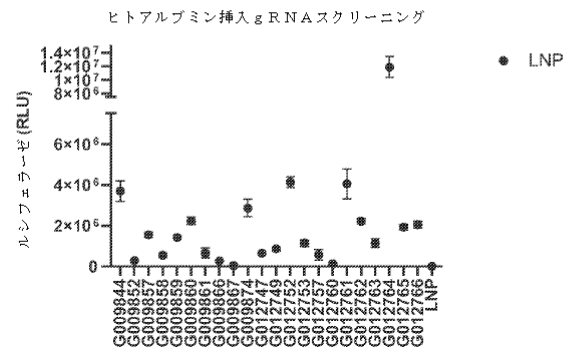
10

20

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】

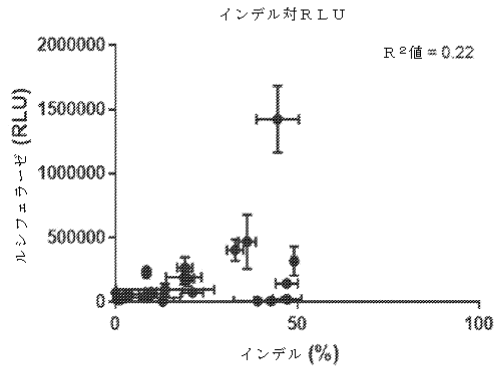


30

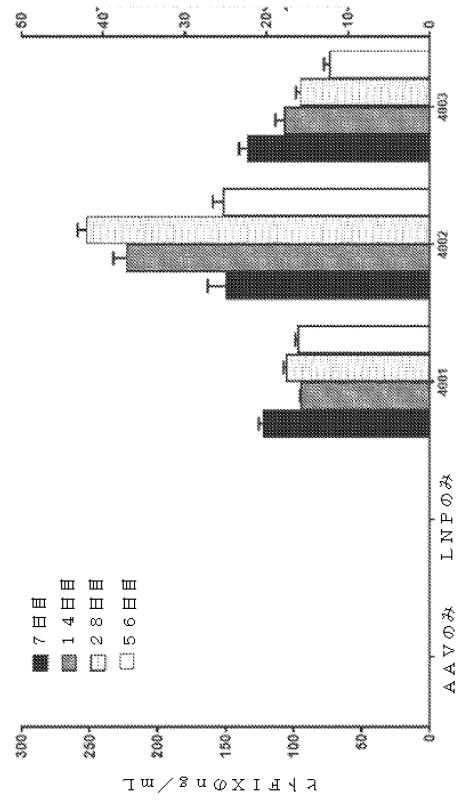
40

50

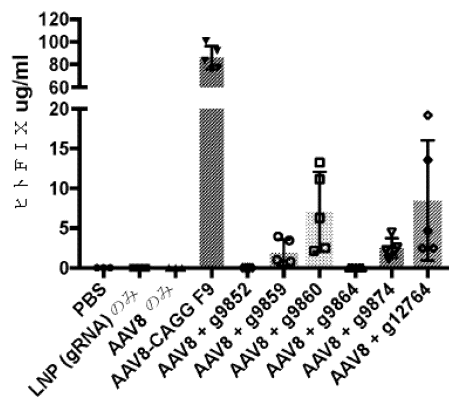
【図 1 4 D】



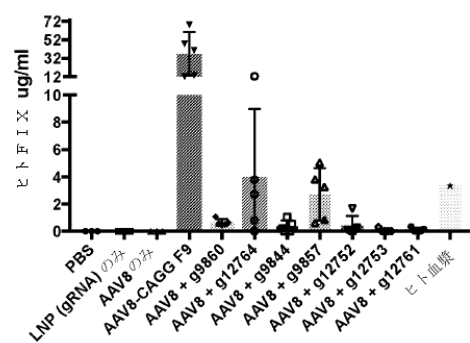
【図 1 5】



【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



10

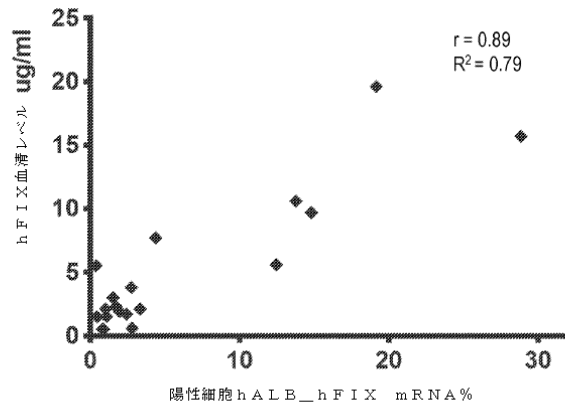
20

30

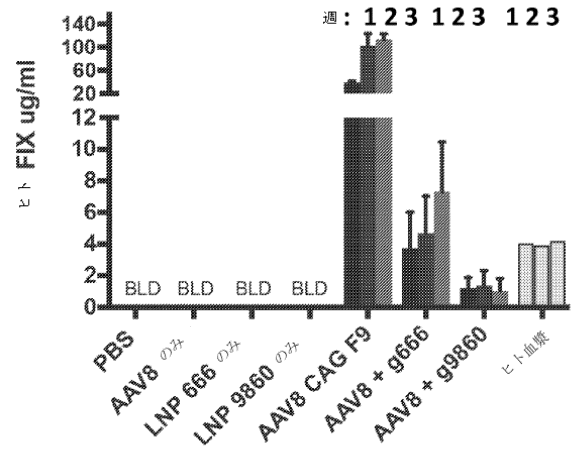
40

50

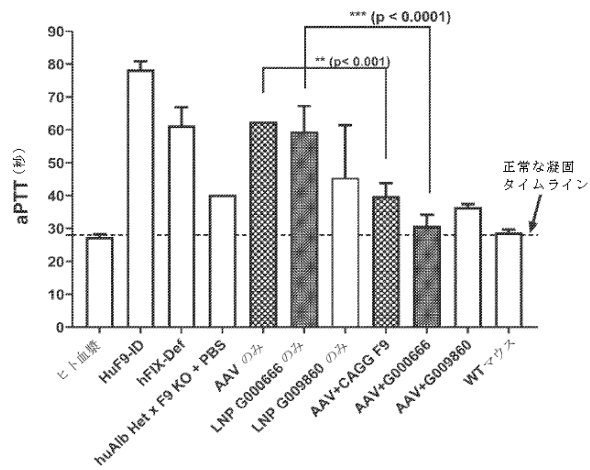
【図 17】



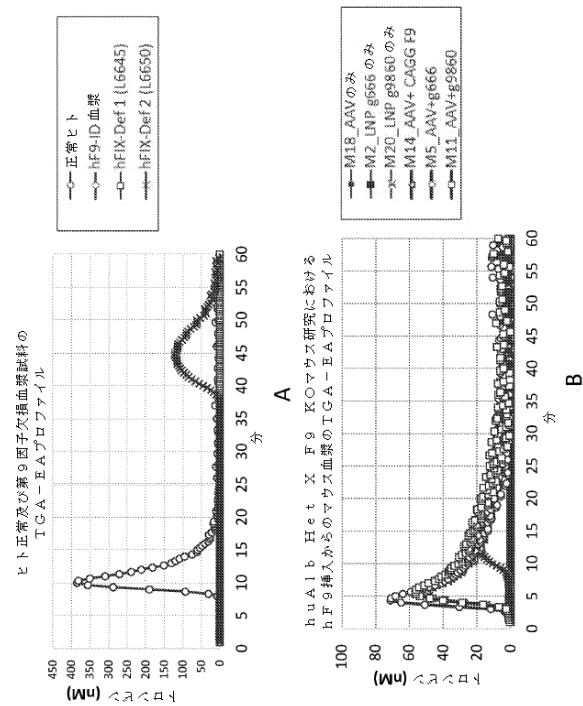
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

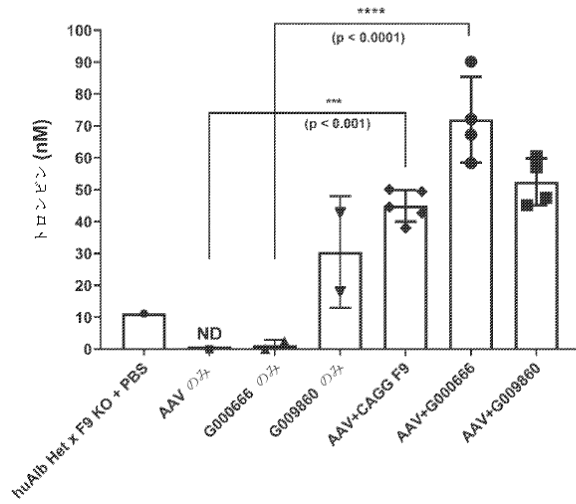
20

30

40

50

【図 2 1】



10

【配列表】

0007578590000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/864 (2006.01)

C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z

C 1 2 N 15/55 (2006.01)

C 1 2 N 15/55

C 1 2 N 15/31 (2006.01)

C 1 2 N 15/31

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/829,009

(32)優先日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/840,352

(32)優先日 平成31年4月29日(2019.4.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士法人平木国際特許事務所

(72)発明者 フィン, ジョナサン ダグラス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, スイート 1 3 0, エリー ス
トリート 4 0, インテリア セラピューティクス, インコーポレーテッド

(72)発明者 ファン, ホンーレン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, スイート 1 3 0, エリー ス
トリート 4 0, インテリア セラピューティクス, インコーポレーテッド

(72)発明者 ロイ, モイトリ

アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州, ケンブリッジ, スイート 1 3 0, エリー ス
トリート 4 0, インテリア セラピューティクス, インコーポレーテッド

(72)発明者 ライ, ケーディー

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド

(72)発明者 サットラー, レイチェル

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド

(72)発明者 カイラトサウス, クリストス

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド

(72)発明者 ワン, チェン

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 ニューヨーク州, タリータウン, オールド ソー ミル リバー ロード
7 7 7, リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特表2016-521975 (JP, A)

特表2017-500061 (JP, A)

特表2017-504354 (JP, A)

国際公開第2017/093804 (WO, A2)

国際公開第2017/091512 (WO, A1)

特表2022-513365 (JP, A)

BLOOD, 2015年, Vol.126, No.15, pp.1777-1784

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)