

前記 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

【請求項 5】

前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドが 2' - O - Me、2' - F、または 2' - O - m o e 修飾の 1 つまたは複数を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

【請求項 6】

m U * m U * m A * C A G C C A C G U C U A C A G C A 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 2 4 2) を含み、

* は、ヌクレオチドが次のヌクレオチドに P S 結合で連結されていることを示し、

小文字「m」は、ヌクレオチドが 2' - O - Me で修飾されていることを示し、請求項 1 に記載の s g R N A。

【請求項 7】

m N * m N * m N * N N N N 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 5 8) を含み、

* は、ヌクレオチドが次のヌクレオチドに P S 結合で連結されていることを示し、

小文字「m」は、ヌクレオチドが 2' - O - Me で修飾されていることを示し、

N は、任意のヌクレオチドである、請求項 1 に記載の s g R N A。

【請求項 8】

S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 とリボ核タンパク質複合体を形成する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

【請求項 9】

脂質ナノ粒子 (L N P) と会合した請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の s g R N A を含む、組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の前記 s g R N A、または請求項 9 に記載の前記組成物を含み、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードする m R N A をさらに含む、組成物。

【請求項 11】

前記ヌクレアーゼが C a s タンパク質である、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記ヌクレアーゼが C a s 9 である、請求項 10 又は 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ヌクレアーゼが S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 である、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ヌクレアーゼがニッカーゼまたは改変されたヌクレアーゼである、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記ヌクレアーゼが核局在シグナル (N L S) を含む、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の s g R N A、または請求項 9 ~ 15 のいずれか 1

10

20

30

40

50

項に記載の組成物を含み、薬学的に許容される担体を含む、医薬製剤。

【請求項 17】

標的 DNA を改変する *in vitro* 方法であって、

Cas タンパク質または Cas タンパク質をコードする核酸と、以下：

a. 請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の sgRNA；

b. 請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物；または

c. 請求項 16 に記載の医薬製剤のうちのいずれか 1 つまたは複数と、を細胞に送達することを含む、方法。

【請求項 18】

疾患または障害の治療において使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の sgRNA を含む組成物、請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 16 に記載の医薬製剤。

10

【請求項 19】

細胞における標的 DNA を修飾するのに使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の sgRNA を含む組成物、請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 16 に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、ASCII フォーマットで電子的に提出された配列表を含み、該配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。前記 ASCII コピーは 2017 年 12 月 7 日に作成され、01155-0004-00PCT_SeqList.txt という名称であり、118,877 バイトのサイズである。

20

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2016 年 12 月 8 日に提出された米国特許仮出願第 62/431,756 号の優先権の利益を主張し、該仮出願は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0003】

本開示は、外因性遺伝因子を認識しかつ切断する原核性免疫系の一部である CRISPR/Cas システムを使用する遺伝子編集の分野に関する。CRISPR/Cas システムは、DNA の部位特異的切断を誘導する CRISPR 関連タンパク質 9 (Cas9) と称される単一のヌクレアーゼに依拠する。Cas9 は、ガイド RNA (gRNA) と称される短鎖 RNA 分子により特定の DNA 配列にガイドされる。ガイド RNA は、trRNA (tracrRNA としても公知) および crRNA (crRNA) を含む。trRNA および crRNA は、シングルガイド RNA (sgRNA) 内に含有される場合があり、またはデュアルガイド RNA (dgRNA) の 2 つの別々の RNA 分子中に含有される場合がある。trRNA および crRNA または sgRNA と組み合わせた Cas9 は、Cas9 リボ核タンパク質複合体 (RNP) と称される。

30

【0004】

オリゴヌクレオチド、特に RNA は、時としてエンドヌクレアーゼ切断またはエキソヌクレアーゼ切断により細胞中および血清中で分解される場合がある。そのような分解を防止し、gRNA の安定性を改善し、かつ遺伝子編集効率を増進させるための改善された方法および組成物が、特に治療応用のために望まれる。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一部の実施形態では、修飾ガイド RNA を含む治療用ゲノム編集ツールが提供される。本明細書に記載される修飾ガイド RNA は、ガイド RNA およびガイド RNA/Cas9 複合体の安定性を改善し、かつ標的 DNA を切断する Cas9 (例えば、SpyCas9 および同等物) の活性を改善し得る。一部の実施形態では、ガイド RNA は sgRNA で

50

ある。一部の実施形態では、ガイドRNAはdgRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAはtracrRNAである。一部の実施形態では、ガイドRNAはcrRNAである。

【0006】

本明細書に記載されるガイドRNAは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含む。修飾は、2'-O-メチル(2'-O-Me)、2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)、2'-フルオロ(2'-F)、ヌクレオチド間のホスホロチオエート(PS)結合、G-C置換、ならびにヌクレオチドおよびその同等物間の逆位脱塩基連結を含んでもよい。本発明の実施形態は以下を含む。

【0007】

一部の実施形態では、シングルガイドRNA(sgRNA)は、5'末端修飾ならびに上部ステム領域；ヘアピン1領域；およびヘアピン2領域のうちの1つまたは複数中に1つまたは複数の修飾を含んで包含され、5'末端修飾は、5'末端の5'末端における最初の7個のヌクレオチドの中に少なくとも2つのホスホロチオエート連結を含む。一部の事例では、修飾は2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドである。一部の実施形態では、修飾は2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドである。

【0008】

一部の実施形態では、sgRNAは、US1~US12において修飾を含み、かつ/またはH1-1において修飾を含み、かつ/またはH2-1の中に修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、H1-1~H1-12および/またはH2-1~H2-15において修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、上方ステム領域、ヘアピン1領域、およびヘアピン2領域のそれぞれの中に1つまたは複数の修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、ヘアピン1領域とヘアピン2領域との間に修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、sgRNAは、下部ステム領域中に修飾を含む。

【0009】

一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端および/または3'末端において修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端の中の3'末端修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端の中の5'末端修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つで修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端の中に3'末端修飾を含み、かつ5'末端の中に5'末端修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つにおいて、および5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つにおいて修飾を含む。一部の事例では、これらの修飾は、2'-O-Me、2'-F、2'-O-moe、またはヌクレオチドを連結するホスホロチオエート(PS)結合である。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つおよび/または5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つの間にPS結合を含む。一部の事例では、sgRNAは、本明細書に記載される1つより多くの修飾、例えばPS結合および2'-O-Me修飾を有する5'末端および3'末端を含む。

【0010】

一部の実施形態では、sgRNAは、バルジ領域中に修飾を含む。一部の実施形態では、バルジ領域中のヌクレオチドの50%は修飾されており、修飾は2'-O-Meまたは2'-Fである。

【0011】

一部の実施形態では、sgRNAは、ネクサス領域中に修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、ネクサス領域中のN15、N16、N17、および/またはN18において修飾を含み、修飾は2'-O-Meまたは2'-Fである。一部の事例では、N16、N17、およびN18はPS結合により連結されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 2 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、少なくとも、修飾された5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチド、および3' 末端の3' 末端における最後の3個のヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、3' 末端および/または5' 末端において修飾を含む。一部の事例では、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチド、および3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドは、ホスホロチオエート (P S) 結合により連結されている。一部の実施形態では、5' および3' 修飾は2' - O - M eまたは2' - O - m o eを含む。一部の実施形態では、5' および3' 修飾は2' - Fを含む。一部の実施形態では、5' および/または3' 修飾は、ヌクレオチドを連結するP S結合を含む。一部の実施形態では、5' および/または3' 修飾は、2' - O - M e、2' - O - m o e、2' - F、およびヌクレオチドを連結するP S結合のうちの1つまたは複数を含む。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチドおよび3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドにおいて修飾を含む。一部の事例では、これらの修飾は、連結するP S結合 (すなわち、最初の4個のヌクレオチドおよび最後の4個のヌクレオチドを連結するP S結合) である。一部の実施形態では、s g R N Aは、5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3' 末端の3' 末端における最後の3個のヌクレオチドにおいて2' - O - M e修飾をさらに含む。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチドおよび3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドにおいて修飾を含み、修飾は少なくとも、4個のヌクレオチドを連結するP S結合であり、さらに、5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3' 末端の3' 末端における最後の3個のヌクレオチドは、2' - O - M e、2' - O - m o e、または2' - F修飾を含む。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、修飾L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、およびL S 1 2を含み、修飾は2' - O - M eまたは2' - Fである。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、バルジ領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて修飾を含み、修飾は2' - O - M eまたは2' - Fである。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて修飾を含み、修飾は2' - O - M eまたは2' - Fである。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、ヘアピン1領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて修飾を含み、修飾は2' - O - M eまたは2' - Fである。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、s g R N Aは、ヘアピン2領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて修飾を含み、修飾は2' - O - M eまたは2' - Fである。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、以下の位置：

- a . 5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドと、
- b . 下部ステム領域中のL S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および/またはL S 1 2と、
- c . バルジ領域中のB 1および/またはB 2と、
- d . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、
- e . ネクサス領域中のN 1 6、N 1 7、および/またはN 1 8と、
- f . ヘアピン1領域中の各ヌクレオチドと、

g. ヘアピン2領域中の各ヌクレオチドと、

h. 3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドと、において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含むsgRNAが包含される。

一部の実施形態では、B3~B6は2'-O-Meで修飾されている。一部の事例では、sgRNAは、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNAは、LS9およびLS10において2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、N15、N16、N17、およびN18において2'F修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14、およびH2-15において2'F修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3' 末端の3' 末端における最後から2つ目、最後から3つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドにおいて2'F修飾を含む。

10

【0022】

一部の実施形態では、以下の位置：

- a. 下部ステム領域中のLS9およびLS10と、
- b. ネクサス領域中のN15、N16、N17、およびN18と、
- c. ヘアピン2領域中のH2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14、およびH2-15と、において2'-F修飾ヌクレオチドを含むsgRNAが包含される。

20

一部の実施形態では、sgRNAは、3' 末端における最後から2つ目、最後から3つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドにおいて2'-F修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドにおいて2'-O-Meまたは2'-F修飾ヌクレオチドを含み、また3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドの3つにおいて2'-O-Meまたは2'-F修飾ヌクレオチドを含む。

【0023】

一部の実施形態では、

- a. 5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- b. LS1および/またはLS6における任意選択の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

30

- c. US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- d. H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチド
- e. ヘアピン1とヘアピン2との間の任意選択の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- f. H2-1~H2-15における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- g. 3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドにおいて2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、5' 末端の5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3' 末端の3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含んで、sgRNAが包含される。

40

【0024】

一部の実施形態では、

- a. 5' 末端の5' 末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- b. LS1~LS6における2'-F修飾ヌクレオチドと、
- c. US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、
- d. H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

50

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 f . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 g . 3' 終端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、
 5' 終端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含んで、 s g R N A が包含される。

【 0 0 2 5 】

一部の実施形態では、

a . 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、 10

b . L S 2 ~ L S 5 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 1 および L S 6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d . U S 1 ~ U S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h . 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、

5' 終端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含んで、 s g R N A が包含される。 20

【 0 0 2 6 】

一部の実施形態では、

a . 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、 30

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g . 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含み、

かつ任意選択で、 5' 終端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含んで、 s g R N A が包含される。

【 0 0 2 7 】

一部の実施形態では、

a . 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、 40

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d . L S 9 および L S 1 0 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h . 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含み、 50

かつ任意選択で、5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(P S)結合および3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合をさらに含んで、s g R N Aが包含される。

【0028】

一部の実施形態では、

a. 5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

b. U S 1 ~ U S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

c. L S 8、L S 1 0、およびL S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

d. L S 7、L S 9、およびL S 1 1における2'-O-F修飾ヌクレオチドと、

10

e. H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

f. ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

g. H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

h. 3'末端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、

5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(P S)結合および3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合をさらに含んで、s g R N Aが包含される。

【0029】

一部の実施形態では、

20

a. 5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

b. L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、およびL S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

c. U S 1 ~ U S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

d. H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

e. ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

f. H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

g. 3'末端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、

30

5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(P S)結合および3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合をさらに含んで、s g R N Aが包含される。

【0030】

一部の実施形態では、

a. 5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

b. L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、およびL S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

c. L S 9およびL S 1 0における2'-F修飾ヌクレオチドと、

40

d. U S 1 ~ U S 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

e. H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

f. ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

g. H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、

h. 3'末端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、

5'末端の5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(P S)結合および3'末端の3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合をさらに含んで、s g R N Aが包含される。

【0031】

50

一部の実施形態では、

- a . 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - b . US 1 ~ US 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - c . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - d . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - e . H 2 - 1 ~ H 2 - 8 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - f . H 2 - 9 ~ H 2 - 1 5 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - g . 3' 末端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - h . 3' 末端における最後のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- を含み、かつ任意選択で、
- 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含んで、 s g R N A が包含される。

10

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、

- a . 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - b . US 1 ~ US 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - c . H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 1 0、および H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチド；と、
 - d . H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、および H 1 - 1 1 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - f . H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 1 0、H 2 - 1 2；および H 2 - 1 4 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - g . H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 1 1；H 2 - 1 3、および H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 - h . 3' 末端における最後から 2 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
 - i . 3' 末端の 3' 末端における最後から 3 つ目および最後のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含み、
- かつ任意選択で、 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含んで、 s g R N A が包含される。

20

30

【 0 0 3 3 】

一部の実施形態では、

- a . 2' - O - Me 修飾ヌクレオチド L S 8、L S 1 0、L S 1 2、H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 1 0、H 1 - 1 2、H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 1 1、H 2 - 1 3、および H 2 - 1 5 と、
 - b . L S 7、L S 9、L S 1 1；H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、H 1 - 1 1、H 1 - 1 3、H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 1 0、H 2 - 1 2、および H 2 - 1 4 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、を含み、かつ任意選択で、
- 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含み、かつ任意選択で、
- c . 3' 末端の 3' 末端における最後および最後から 3 つ目のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチド；および / または

40

50

d. 3' 末端の 3' 末端における最後から 2 つ目、最後から 4 つ目、および / または最後のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含んで、sgRNA が包含される。

【0034】

一部の実施形態では、表 4 の修飾を含む配列番号 228 ~ 353 のうちのいずれかの核酸を含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、表 4 の修飾を含む配列番号 228 ~ 332 のうちのいずれかを含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、表 4 の修飾を含む配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 のうちのいずれかを含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、配列番号 240 を含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、表 4 の修飾を含む配列番号 240 を含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、配列番号 242 を含んで sgRNA が包含される。一部の実施形態では、配列番号 358 を含んで sgRNA が包含される。追加の実施形態では、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 のうちのいずれか 1 つの核酸に対して少なくとも 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70 % の同一性を有する核酸を含み、表 4 における参照配列識別子のヌクレオチドに対応する sgRNA の各ヌクレオチドにおける修飾が表 4 における参照配列識別子に示される修飾と同一または同等である sgRNA は、任意選択で、5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、ヘアピン 1 領域中のヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、ヘアピン 2 領域中のヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、上部ステム領域中のヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、S. ピオゲネス (S. Pyogenes) の Cas9 とリボ核タンパク質複合体を形成する。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図 1】図 1 は、Cas9 mRNA および非修飾 trRNA (TR000002) と共に修飾 crRNA を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の次世代配列 (NGS) によって測定された編集パーセントを示す。

【図 2】図 2 は、非修飾 crRNA (CR000686) および Cas9 mRNA と共に修飾 trRNA を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の NGS によって測定された編集パーセントを示す。

【図 3】図 3 は、Cas9 mRNA ならびに親配列においては見られない G - C ペアリングを有する crRNA および trRNA を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の NGS によって測定された編集パーセントを示す。

【図 4】図 4 は、Cas9 mRNA と共に修飾 crRNA および trRNA を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の NGS によって測定された編集パーセントを示す。標準偏差が値の後に示されている。

【図 5】図 5 は、Cas9 mRNA と共に修飾 sgRNA を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の NGS によって測定された編集パーセントを示す。

【図 6】図 6 は、Cas9 mRNA と共に修飾 crRNA および非修飾 trRNA (TR000002) を用いた Neuro2A 細胞のトランスフェクション後のマウス TTR 遺伝子の NGS によって測定された編集パーセントを示す。星印は、技術的理由によりこの実験において活性を示さなかったデュアルガイドを表す。このデュアルガイドは図 9 に表す実験において再び試験され、該試験において編集活性を示した。

【図 7】図 7 は、Cas9 mRNA と共に非修飾 crRNA (CR000686) およ

び修飾 t r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R 遺伝子の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 8】図 8 は、C a s 9 m R N A ならびに親配列においては見られない G - C ペアリングまたは G - U ミスマッチを有する c r R N A および t r R N A ペアリングを用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R 遺伝子の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 9】図 9 は、C a s 9 m R N A と共に修飾 c r R N A および修飾 t r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R 遺伝子の N G S によって測定された編集パーセントを示す。標準偏差が値の後に示されている。

【図 10】図 10 は、C a s 9 m R N A と共に修飾 s g R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R 遺伝子の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

10

【図 11】図 11 は、C a s 9 m R N A と共に修飾 s g R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス第 V I I 因子 (F V I I) 遺伝子の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 12 A】図 12 A は、C a s 9 m R N A と共に修飾 c r R N A および非修飾 t r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 12 B】図 12 B は、C a s 9 m R N A と共に修飾 c r R N A および非修飾 t r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後の F V I I の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

20

【図 13 A】図 13 A は、C a s 9 m R N A と共に修飾 t r R N A および非修飾 c r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後のマウス T T R の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 13 B】図 13 B は、C a s 9 m R N A と共に修飾 t r R N A および非修飾 c r R N A を用いた N e u r o 2 A 細胞のトランスフェクション後の F V I I の N G S によって測定された編集パーセントを示す。

【図 14 A】図 14 A は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中のインターフェロナルファ (I F N - アルファ) レベルを示す。

【図 14 B】図 14 B は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中のインターロイキン 6 (I L - 6) レベルを示す。

30

【図 14 C】図 14 C は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の単球走化性タンパク質 1 (M C P - 1) レベルを示す。

【図 14 D】図 14 D は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の腫瘍壊死因子アルファ (T N F - アルファ) レベルを示す。

【図 15 A】図 15 A は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 15 A は肝臓における総編集パーセンテージを示す。

【図 15 B】図 15 B は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 15 B は血清 T T R レベルを示す。

【図 15 C】図 15 C は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 15 C は図 15 A の結果の平均および標準偏差を示す。

40

【図 15 D】図 15 D は G 0 0 0 2 0 9 s g R N A (配列番号 2 2 8) への修飾を要約する。太字のヌクレオチドは 2 ' - O - M e 修飾されている。

【図 15 E】図 15 E は G 0 0 0 2 6 7 s g R N A (配列番号 2 3 4) への修飾を要約する。太字のヌクレオチドは 2 ' - O - M e 修飾されている。

【図 16 A】図 16 A は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中のインターフェロナルファ (I F N - アルファ) レベルを示す。

【図 16 B】図 16 B は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の腫瘍壊死因子アルファ (T N F - アルファ) レベルを示す。

【図 16 C】図 16 C は、C a s 9 m R N A および s g R N A を含む L N P の i n v i

50

v o 投与後の血清中のインターロイキン 6 (I L - 6) レベルを示す。

【図 1 6 D】図 1 6 D は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の単球走化性タンパク質 1 (M C P - 1) レベルを示す。

【図 1 7 A】図 1 7 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 7 A は肝臓における総編集パーセンテージを示す。

【図 1 7 B】図 1 7 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 7 B は図 1 7 A の結果の平均および標準偏差を示す。

【図 1 7 C】図 1 7 C は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 7 C は血清 T T R レベルを示す。

【図 1 7 D】図 1 7 D は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 7 D は図 1 7 B の結果の平均および標準偏差を示す。

【図 1 8 A】図 1 8 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 8 A は肝臓における総編集のパーセンテージを示す。

M P K = ミリグラム / キログラム ; B L O D = 検出レベル未満である。

【図 1 8 B】図 1 8 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 8 B は肝臓の編集データを要約する。M P K = ミリグラム / キログラム ; B L O D = 検出レベル未満である。

【図 1 8 C】図 1 8 C は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 1 8 C は血清 T T R レベルを示す。M P K = ミリグラム / キログラム ; B L O D = 検出レベル未満である。

【図 1 9 A】図 1 9 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中のインターフェロナルファ (I F N - アルファ) レベルを示す。

【図 1 9 B】図 1 9 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の単球走化性タンパク質 1 (M C P - 1) レベルを示す。

【図 1 9 C】図 1 9 C は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中のインターロイキン 6 (I L - 6) レベルを示す。

【図 1 9 D】図 1 9 D は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の血清中の腫瘍壊死因子アルファ (T N F - アルファ) レベルを示す。

【図 2 0 A】図 2 0 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の F V I I 遺伝子座の肝臓における編集を示す。

【図 2 0 B】図 2 0 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の i n v i v o 投与後の T T R 遺伝子座の肝臓における編集を示す。

【図 2 1 A】図 2 1 A は、注射した s g RNA (配列番号 3 4 1) の図式を示す。

【図 2 1 B】図 2 1 B は、注射なしの d g RNA C R 0 0 0 6 8 6 (配列番号 1) および T R 0 0 0 0 0 2 (配列番号 1 8 8) の図式を示す。

【図 2 1 C】図 2 1 C は、注射した d g RNA C R 0 0 0 6 8 6 (配列番号 1) および T R 0 0 0 0 0 2 (配列番号 1 8 8) の図式を示す。

【図 2 2 A】図 2 2 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 2 2 A は肝臓における T T R 遺伝子座の総編集のパーセンテージを示す。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 2 2 B は肝臓の編集データを要約する。

【図 2 2 C】図 2 2 C は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 2 2 C は血清 T T R レベルを示す。

【図 2 3 A】図 2 3 A は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 2 3 A は肝臓における T T R 遺伝子座の総編集のパーセンテージを示す。

【図 2 3 B】図 2 3 B は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の i n v i v o の結果を示す。図 2 3 B は肝臓の編集データを要約する。

【図 2 3 C】図 2 3 C は、C a s 9 mRNA および s g RNA を含む L N P の投与後の

10

20

30

40

50

*in vivo*の結果を示す。図23Cは血清TTRレベルを示す。

【図24A】図24Aは、Cas9 mRNAおよびsgRNAを含むLNPの投与後の初代マウス肝細胞における編集を示す。図24AはTTR遺伝子座の総編集の編集パーセンテージを示す。

【図24B】図24Bは、Cas9 mRNAおよびsgRNAを含むLNPの投与後の初代マウス肝細胞における編集を示す。図24Bは、EC50を算出するために使用したmRNA用量の関数として編集パーセンテージの正規化された変換を示す。

【図24C】図24Cは、Cas9 mRNAおよびsgRNAを含むLNPの投与後の初代マウス肝細胞における編集を示す。図24Cは試験したLNPに対するEC50値を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0036】

遺伝子編集方法において使用するためのデュアルガイドRNAおよびシングルガイドRNAを含む修飾ガイドRNAが本明細書で提供される。修飾ガイドは、それらの非修飾対応物と比較してより安定であり、かつ改善された*in vitro*有効性および*in vivo*有効性を示す。操作および試験したガイドRNAの配列を表4に示す。

20

30

40

50

【表 1】

表 4

配列 番号	名称	別名	説明	配列
	crRNA			
1	CR000686		非修飾	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUUUUUG
2	CR003393	CR686-1	上部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGUUUUAGAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
3	CR003394	CR686-2	部分的上部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGUUUUAGAGCUAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
4	CR003395	CR686-3	部分的上部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUAmAmAmAmAmAmG
5	CR003396	CR686-4	部分的上部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUAmAmAmAmG
6	CR003397	CR686-5	下部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
7	CR003398	CR686-6	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
8	CR003399	CR686-7	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
9	CR003400	CR686-8	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
10	CR003401	CR686-9	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
11	CR003402	CR686-10	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
12	CR003403	CR686-11	下部ウオーク	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
13	CR003404	CR686-12	部分の下部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
14	CR003405	CR686-13	部分の下部	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
15	CR003406	CR686-GC1	下部 GC	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGCGCAGAGCUAUGCUUUUUG
16	CR003407	CR686-GC3	上部 GC	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGmGmGmGmGmGmGmGmGmAmAmAmAmAmAmG
17	CR003408	CR686-GC5	下部上部 GC	CCAGUCCAGCAGGCAAGGGGCGCAGAGCUAUGCUUUUUG
18	CR003409	CR686 all 0Me		mCmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG mCmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
19	CR003393 - mod only		上部	GUUUUAGAGAGCUAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
20	CR003394 - mod only		部分的上部	GUUUUAGAGAGCUAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
21	CR003395 - mod only		部分的上部	GUUUUAGAGAGCUAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
22	CR003396 - mod only		部分的上部	GUUUUAGAGAGCUAUGCUAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
23	CR003397 - mod only		下部	mGmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmAmG
24	CR003398 - mod only		下部ウオーク	mGUUUUAGAGAGCUAUGCUUUUUG

10

20

30

40

50

配列番号	名称	別名	説明	配列
25	CR003399 - mod only		下部ウオーク	GmlUUUAGAGCUAUGCUUUUUG
26	CR003400 - mod only		下部ウオーク	GmlUUUAGAGCUAUGCUUUUUG
27	CR003401 - mod only		下部ウオーク	GUUmlUAGAGCUAUGCUUUUUG
28	CR003402 - mod only		下部ウオーク	GUUmlUAGAGCUAUGCUUUUUG
29	CR003403 - mod only		下部ウオーク	GUUmlUAGAGCUAUGCUUUUUG
30	CR003404 - mod only		部分的下部	GmlmlmlmlAGAGCUAUGCUUUUUG
31	CR003405 - mod only		部分的下部	GmlmlmlUAGAGCUAUGCUUUUUG
32	CR003721	CR686-14	上部および下部	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlGmCmlUmlUmlG
33	CR003722	CR686-15	下部コンボ	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAGCUAUGCUUUUUG
34	CR003723	CR686-16	上部、下部コンボ	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
35	CR003724	CR686-17	下部コンボ	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAGCUAUGCUUUUUG
36	CR003725	CR686-18	上部、下部コンボ	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
37	CR003726	CR686-19	ネクススウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
38	CR003727	CR686-20	ネクススウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
39	CR003728	CR686-21	ネクススウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
40	CR003729	CR686-22	ネクススウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
41	CR003730	CR686-23	2' F 下部ウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG
42	CR003731	CR686-24	2' F 下部ウォーク	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGmGUUmlUmlAGAmGmCmlUmlUmlGmCmlUmlUmlG

10

20

30

40

50

[illegible]

配列番号	名称	別名	説明	配列
61	CR003729-mod only	CR686-22-mod only	ネクススウォーク	GUUUAGFAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
62	CR003730-mod only	CR686-23-mod only	2' F 下部ウォーク	GFUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
63	CR003731-mod only	CR686-24-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
64	CR003732-mod only	CR686-25-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
65	CR003733-mod only	CR686-26-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
66	CR003734-mod only	CR686-27-mod only	2' F 下部コンボ	FGUUUUUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
67	CR003735-mod only	CR686-28-mod only	下部 alt	FGmUUUUUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
68	CR003736-mod only	CR686-29-mod only	下部 alt	mGFUUUUUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
69	CR003737-mod only	CR686-GC6-mod only	下部 GC	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
70	CR003738-mod only	CR686-GC7-mod only	下部 C ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
71	CR003739-mod only	CR686-GC8-mod only	下部 C ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
72	CR003740-mod only	CR686-GC9-mod only	下部 C ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
73	CR003741-mod only	CR686-GC10-mod only	下部 C ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmCmUmUmUmUmG
74	CR000705		非修飾	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG
75	CR004188	CR705-1	上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUmUmUmUmG
76	CR004189	CR705-2	部分的上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUmUmUmUmG
77	CR004190	CR705-3	部分的上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUmUmUmUmG
78	CR004191	CR705-4	部分的上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUmUmUmUmG
79	CR004192	CR705-5	下部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG
80	CR004193	CR705-6	下部ウォーク	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG
81	CR004194	CR705-7	下部ウォーク	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG
82	CR004195	CR705-8	下部ウォーク	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG
83	CR004196	CR705-9	下部ウォーク	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUUAGCUUUUUG

10

20

30

40

50

配列番号	名称	別名	説明	配列
84	CR004197	CR705-10	下部ウオーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
85	CR004198	CR705-11	下部ウオーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
86	CR004199	CR705-14	上部および下部	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
87	CR004200	CR705-15	下部コンボ	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
88	CR004201	CR705-16	上部、下部コンボ	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
89	CR004202	CR705-17	下部コンボ	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
90	CR004203	CR705-18	上部、下部コンボ	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
91	CR004204	CR705-19	ネクススウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
92	CR004205	CR705-20	ネクススウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
93	CR004206	CR705-21	ネクススウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
94	CR004207	CR705-22	ネクススウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
95	CR004208	CR705-23	2' F 下部ウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
96	CR004209	CR705-24	2' F 下部ウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
97	CR004210	CR705-25	2' F 下部ウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
98	CR004211	CR705-26	2' F 下部ウォーク	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG
99	CR004212	CR705-27	2' F 下部コンボ	UUACAGCCACGCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUG

10

20

30

40

50

配列番号	名称	別名	説明	配列
121	CR004205-mod only	CR705-20-mod only	ネクサスウォーク	GUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
122	CR004206-mod only	CR705-21-mod only	ネクサスウォーク	GAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
123	CR004207-mod only	CR705-22-mod only	ネクサスウォーク	GfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
124	CR004208-mod only	CR705-23-mod only	2' F 下部ウォーク	GfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
125	CR004209-mod only	CR705-24-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
126	CR004210-mod only	CR705-25-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
127	CR004211-mod only	CR705-26-mod only	2' F 下部ウォーク	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
128	CR004212-mod only	CR705-27-mod only	2' F 下部コンボ	FfGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
129	CR004213-mod only	CR705-28-mod only	下部 alt	FfGmUfUmUfUmAmAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
130	CR004214-mod only	CR705-29-mod only	下部 alt	mGfUmUfUmUfUmAmAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
131	CR000657		非修飾	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG
132	CR004218	CR657-1	上部	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
133	CR004219	CR657-2	部分的上部	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAAmUmGmCmUmUmUmUmG
134	CR004220	CR657-3	部分的上部	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCmUmUmUmUmUmG
135	CR004221	CR657-4	部分的上部	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUmUmUmUmUmG
136	CR004222	CR657-5	下部	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAmGmCmUmUmUmUmGAGCUAUGCUUUUG
137	CR004223	CR657-6	下部ウォーク	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG
138	CR004224	CR657-7	下部ウォーク	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG
139	CR004225	CR657-8	下部ウォーク	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG
140	CR004226	CR657-9	下部ウォーク	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG
141	CR004227	CR657-10	下部ウォーク	CAGGGCUUUGAAGAUUCCGCUUUUAGAGCUAUGCUUUUG

10

20

30

40

50

配列番号	名称	別名	説明	配列
142	CR004228	CR657-11	下部ウオーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUG
143	CR004229	CR657-14	上部および下部	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
144	CR004230	CR657-15	下部コンボ	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUG
145	CR004231	CR657-16	上部、下部コンボ	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
146	CR004232	CR657-17	下部コンボ	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUG
147	CR004233	CR657-18	上部、下部コンボ	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
148	CR004234	CR657-19	ネクススウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
149	CR004235	CR657-20	ネクススウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
150	CR004236	CR657-21	ネクススウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
151	CR004237	CR657-22	ネクススウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
152	CR004238	CR657-23	2' F 下部ウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
153	CR004239	CR657-24	2' F 下部ウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
154	CR004240	CR657-25	2' F 下部ウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
155	CR004241	CR657-26	2' F 下部ウォーク	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
156	CR004242	CR657-27	2' F 下部コンボ	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGCUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmUmG

10

20

30

40

50

配列番号	名称	別名	説明	配列
157	CR004243	CR657-28	下部 alt	CAGGGCUCUUGAAGAUCCCTGmUfUmlUfUmAGmGmCmUmlAmUmlmGmCmUmlmUmlmUmlmG
158	CR004244	CR657-29	下部 alt	CAGGGCUCUUGAAGAUCCUCCmGfUmlUfUmUfAGAmGmCmUmlAmUmlmGmCmUmlmGmUmlmUmlmUmlmG
159	CR004245	CR657-GC1	下部 GC	CAGGGCUCUUGAAGAUCCGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUG
160	CR004246	CR657-GC3	上部 GC	CAGGGCUCUUGAAGAUCCCGUUUAGAGCUAUGCUGGCGG
161	CR004218-mod only	CR657-1-mod only	上部	GUUUUAGAmGmCmUmlAmUmlmGmCmUmlmUmlmUmlmG
162	CR004219-mod only	CR657-2-mod only	部分的上部	GUUUUAGAGCUAmUmlmGmCmUmlmUmlmUmlmUmlmG
163	CR004220-mod only	CR657-3-mod only	部分的上部	GUUUUAGAGCUAUGCmUmlmGmUmlmUmlmUmlmG
164	CR004221-mod only	CR657-4-mod only	部分的上部	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmlmUmlmUmlmG
165	CR004222-mod only	CR657-5-mod only	下部	mGmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG
166	CR004223-mod only	CR657-6-mod only	下部ウオーク	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
167	CR004224-mod only	CR657-7-mod only	下部ウオーク	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
168	CR004225-mod only	CR657-8-mod only	下部ウオーク	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
169	CR004226-mod only	CR657-9-mod only	下部ウオーク	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
170	CR004227-mod only	CR657-10-mod only	下部ウオーク	GUUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
171	CR004228-mod only	CR657-11-mod only	下部ウオーク	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
172	CR004229-mod only	CR657-14-mod only	上部および下部	mGUUUUmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG
173	CR004230-mod only	CR657-15-mod only	下部コンボ	mGUUUUmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG
174	CR004231-mod only	CR657-16-mod only	上部、下部コンボ	mGUUUUmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG
175	CR004232-mod only	CR657-17-mod only	下部コンボ	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
176	CR004233-mod only	CR657-18-mod only	上部、下部コンボ	mGUUUUmAGAmGmCmUmlmUmlmGmCmUmlmUmlmUmlmUmlmG
177	CR004234-mod only	CR657-19-mod only	ネクスウオー	GUUUUAmGAmGmCmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG
178	CR004235-mod only	CR657-20-mod only	ネクスウオー	GUUUUAmGAmGmCmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmUmlmG

[illegible]

[illegible]

配列番号	名称	別名	説明	配列
242	G000282		mod6	mU*AmU*ACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmGmUImGmCmUIm*AmU
243	G000201		unmod	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCACUAAAAAGUGGACCGAGUGGUGUUU
244	G000331	G211-7	下部 cr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
245	G000332	G211-8	下部 cr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
246	G000333	G211-9	下部 cr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
247	G000334	G211-10	下部 tr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
248	G000335	G211-11	下部 tr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
249	G000336	G211-12	下部 tr	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
250	G000337	G211-13	下部全て	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU
251	G000338	G211-14	下部全て	mU*AmU*AmA*ACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUImAGAmGmCmUImAmGmAmAmAmUImAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUImUImGmAmAmAmAmAmGmUImGmGmCmAmCmCmGmAmGmUImCmGmGmUImGmCmUIm*AmU

10

20

30

40

50

[illegible]

[illegible]

配列番号	名称	別名	説明	配列
270	G000336-mod only	G211-12-mod only	下部 tr	GUUUUAGAGmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUUFUmAFAmAFAmUAAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmU mGmCmU*ml*ml*mlU
271	G000337-mod only	G211-13-mod only	下部全て	mGUUUUmAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAAAmAmUAAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmU mGmCmU*ml*ml*mlU
272	G000338-mod only	G211-14-mod only	下部全て	mGUUUUmAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAFAmAmUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmU mUimGmCmU*ml*ml*mlU
273	G000339-mod only	G211-15-mod only	下部全て	mGUUUUmAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAFAmAmUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmU mUimGmCmU*ml*ml*mlU
274	G000340-mod only	G211-16-mod only	下部全て	FGFUUFUFUFUFAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAAAmAmUAAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmG mGmUimGmCmU*ml*ml*mlU
275	G000341-mod only	G211-17-mod only	下部全て	FGFUUFUFUFUFAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAFAmAmUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimC mGmCmUimGmCmU*ml*ml*mlU
276	G000342-mod only	G211-18-mod only	下部全て	FGFUUFUFUFUFAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAFAmAmUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimC mGmCmUimGmCmU*ml*ml*mlU
277	G000343-mod only	G211-19-mod only	パズルジ er	GUUUUAmGmAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAAAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmUimGmC mU*ml*ml*mlU
278	G000344-mod only	G211-20-mod only	パズルジ tr	GUUUUAGAGAmGmCmUimAmGmAmAmAmUimAmGmCAAGUimUimAAAUAAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmCmUimUmGmAmAmAmAmAmAmGmUimGmCmAmAmCmCmGmAmGmUimCmGmCmUimG mCmU*ml*ml*mlU

10

20

30

40

50

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

配列番号	名称	別名	説明	配列
3316	G000359-mod only	G208-14-mod only	下部全て	mGUUUUmAGAmGmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmGmCAAGImLImAFAmAmUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmLImCmGmAmAmAmAmAmCmAmAmCmGmCmAmCmCmGmAmGmAmCmGmGm mLmCmCmLIm*#mLIm*#mLIm
3317	G000360-mod only	G208-15-mod only	下部全て	mGUUUUmAGAmGmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmGmCAAGUfUImAFAmAfAmUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmGmAmGmLImCmGmG mLmCmCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3318	G000361-mod only	G208-16-mod only	下部全て	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmGmCAAGUImLImAAAmAmUAAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmGmLImCmG mGmLImGmCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3319	G000362-mod only	G208-17-mod only	下部全て	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmGmCAAGUImLImAFAmAmUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmGmLImC mGmCmLImGmCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3320	G000363-mod only	G208-18-mod only	下部全て	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmGmCAAGUfUImAFAmAfAmUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmGmLImC mGmCmLImGmCmCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3321	G000364-mod only	G208-19-mod only	パルジ er	GUUUUAmGmAmGmCmLImAmGmAmAmAmLImAmGmCAAGUUAAMAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmCmLImCmGmCmLImGmC mLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3322	G000365-mod only	G208-20-mod only	パルジ tr	GUUUUAGAmCmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmCmCmAmAmGmLUAAAAUAAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmGmLImCmCmGmLImG mCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3323	G000366-mod only	G208-21-mod only	ネクスス	GUUUUAGAmCmCmLImAmGmAmAmAmAmLImAmCmCAAGUUAAMAUAAAGGCUAGUCCGUUAf UfCfAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmCmLImCmCmGmLImG mCmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm
3324	G000367-mod only	G208-22-mod only	ネクスス	GUUUUAGAmCmCmLImImGmAmAmAmAmAmLImAmCmCAAGUUAAMAUAAAGGCUAGUCCGUUAUm mCmAmAmCmLImImGmAmAmAmAmAmAmAmCmCmAmCmGmCmAmCmCmGmAmCmLImCmCmGmLImGm CmLIm*#mLIm*#mLIm*#mLIm

[illegible]

[illegible]

[illegible]

【 0 0 3 7 】

「ガイドRNA」および「gRNA」は、総称的にsgRNA、trRNA (tracrRNAとしても公知)、またはcrRNA (CRISPR RNAとしても公知)のいずれかを指すために本明細書で交換可能に使用される。crRNAおよびtrRNAは、1つのRNA分子上に会合してよく(シングルガイドRNA [sgRNA])、または2つの別々のRNA分子中にあってもよい(デュアルガイドRNA [dgRNA])。「ガイドRNA」または「gRNA」は各種類を指す。

【 0 0 3 8 】

t r R N A 配列は天然に存在するものであってよく、または t r R N A 配列は天然に存

在する配列と比較して修飾またはバリエーションを含んでもよい。

【0039】

本明細書で使用される「編集効率」または「編集パーセンテージ」または「編集パーセント」は、Cas RNPによる切断後の配列リードの総数に対する対象の標的領域へのヌクレオチドの挿入または欠失を有する配列リードの総数である。

【0040】

本明細書で使用される「ヘアピン」は、核酸鎖がフォールディングして同じ鎖の別の区分と塩基対を形成した時に作られる核酸のループを表す。ヘアピンは、ループまたはU字形を含む構造を形成する場合がある。一部の実施形態では、ヘアピンはRNAループを含んでもよい。ヘアピンは、結合して一緒になった単一の核酸分子中で、分子のフォールディングまたはリンクリング(wrinkling)と共に、2つの相補的配列により形成することができる。一部の実施形態では、ヘアピンはステムまたはステムループ構造を含む。

10

【0041】

本明細書で使用される「領域」は、核酸の保存された群を表す。領域はまた、「モジュール」または「ドメイン」と称される場合もある。gRNAの領域は特定の機能を行う場合があり、例えば、Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333-339 (2014)に記載されるように、RNPのエンドヌクレアーゼ活性を方向付ける。gRNAの領域は表1~3に記載される。

【0042】

本明細書で使用される「リボ核タンパク質」(RNP)または「RNP複合体」は、例えば、Casタンパク質などのヌクレアーゼと一緒にあったgRNAを表す。一部の実施形態では、RNPはCas9およびgRNAを含む。

20

【0043】

本明細書で使用される「ステムループ」は、対形成していない核酸のループで終わる塩基対を形成した「ステム」を形成するヌクレオチドの二次構造を表す。ステムは、同じ核酸鎖の2つの領域の配列が反対方向に読まれた時に少なくとも部分的に相補的である場合に形成される場合がある。本明細書で使用される「ループ」は、ステムをキャップする場合がある塩基対形成していない(すなわち、相補的でない)ヌクレオチドの領域を表す。「テトラループ」は4個のヌクレオチドのループを表す。本明細書で使用される場合、sgRNAの上部ステムはテトラループを含んでもよい。

30

【0044】

dgRNAを伴うある特定の実施形態では、本明細書で使用される「ステム」領域は、crRNAのある特定の領域とtrRNAのある特定の領域(例えば、各RNAの下部ステム領域と上部ステム領域)との間に塩基対を形成した領域を形成するヌクレオチドの二次構造を表す。dgRNAの「ステム」領域は、当該技術分野において「フラッグポール」領域と称されてもよい。

【0045】

本明細書で使用される「治療」は、対象における疾患のための治療的な任意の投与または塗布を包含し、また疾患を抑制し、その進行を阻み、疾患の1つもしくは複数の症状を緩和し、疾患を治癒し、または疾患の1つもしくは複数の症状の再発を予防することを含む。

40

【0046】

1. 修飾の種類

A. 2'-O-メチル修飾

修飾された糖は、相補鎖にとってのオリゴヌクレオチド結合親和性、デュプレックス形成、およびヌクレアーゼとの相互作用に影響する物理的性質である、ヌクレオチドの糖環のパッカリングを制御すると考えられている。したがって、糖環上の置換は、これらの糖の確認およびパッカリングを変化させることができる。例えば、2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾は、オリゴヌクレオチドの結合親和性およびヌクレアーゼ安定性を増加させることができるが、実施例に示されるように、オリゴヌクレオチド中の所与の位置にお

50

ける任意の修飾の効果は経験的に決定される必要がある。

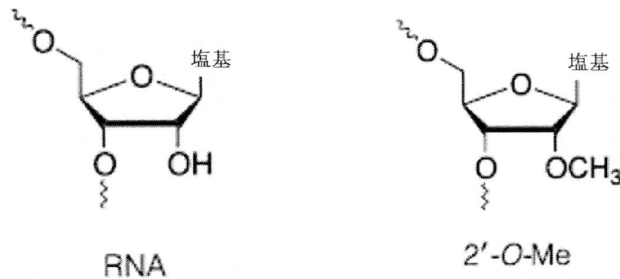
【0047】

「mA」、「mC」、「mU」、または「mG」という用語は、2'-O-Meで修飾されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。

【0048】

2'-O-メチルリボヌクレオチドとしてのリボヌクレオチドの修飾は以下の通りに描写することができる：

【化1】



10

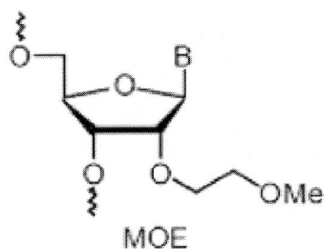
【0049】

B. 2'-O-(2-メトキシエチル)修飾

一部の実施形態では、修飾は2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)であってもよい。2'-O-moeリボヌクレオチドとしてのリボヌクレオチドの修飾は以下の通りに描写することができる：

20

【化2】



30

【0050】

「moeA」、「moeC」、「moeU」、または「moeG」という用語は、2'-O-moeで修飾されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。

【0051】

C. 2'-フルオロ修飾

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

40

【0052】

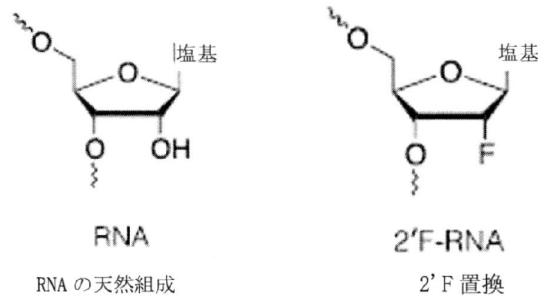
本出願において、「fA」、「fC」、「fU」、または「fG」という用語は、2'-Fで置換されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。

【0053】

2'-Fの置換は以下の通りに描写することができる：

50

【化 3】



10

【0054】

D. ホスホロチオエート修飾

ホスホロチオエート (PS) 連結または結合は、ホスホジエステル連結中、例えばヌクレオチド塩基間の結合中の 1 つの非架橋性リン酸酸素を硫黄が置換している結合を指す。オリゴヌクレオチドを生成するためにホスホロチオエートが使用される場合、修飾オリゴヌクレオチドは S - オリゴと称される場合もある。

【0055】

「*」は PS 修飾を描写するために使用される場合がある。本出願において、A*、C*、U*、または G* という用語は、次 (例えば、3') のヌクレオチドに PS 結合で連結されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。

20

【0056】

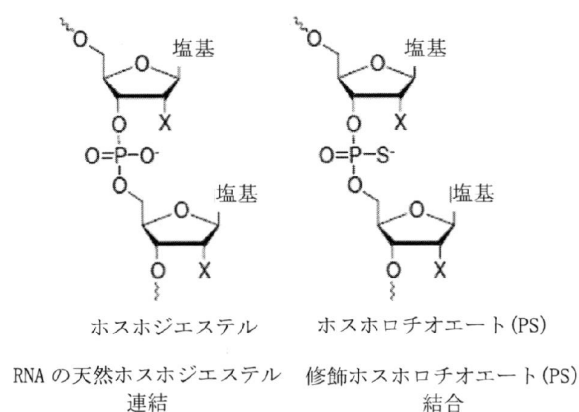
本出願では、「mA*」、「mC*」、「mU*」、または「mG*」という用語は、2' - O - Me で置換され、かつ次 (例えば、3') のヌクレオチドに PS 結合で連結されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。同様に、「fA*」、「fC*」、「fU*」または「fG*」という用語は、2' - F で置換され、かつ次 (例えば、3') のヌクレオチドに PS 結合で連結されたヌクレオチドを表すために使用される場合がある。PS 連結または結合の同等物は、本明細書に記載される実施形態に包含される。

【0057】

以下の図解は、ホスホジエステル結合の代わりに PS 結合を生成する、S - による非架橋性リン酸酸素への置換を示す：

30

【化 4】



40

【0058】

E. G - C 置換

一部の実施形態では、gRNA は、化学修飾を含まない配列置換により修飾されている。一部の実施形態では、修飾 gRNA は、親 gRNA 配列においては見られない (例えば、下部ステム領域および / または上部ステム領域中の) G - C ペアリングを用いて操作されている。一部の実施形態では、修飾 gRNA は、親 gRNA 配列においては見られない

50

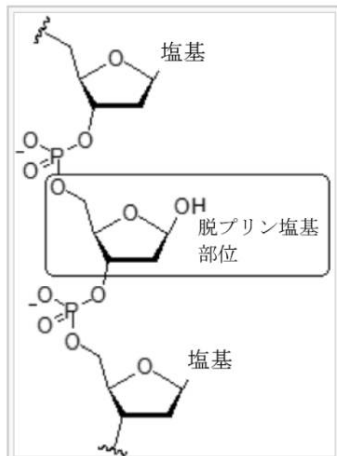
G - U mismatches (「GUウオブル」または mismatches pairing) により操作されている。

【0059】

F. 逆位脱塩基修飾

脱塩基ヌクレオチドは、窒素塩基を欠くヌクレオチドを指す。下記の図は、塩基を欠いた脱塩基（脱プリン塩基としても公知）部位を有するオリゴヌクレオチドを描写する：

【化5】



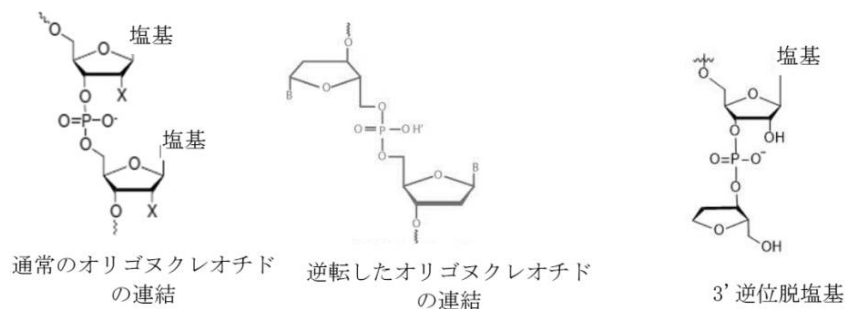
10

20

【0060】

逆位塩基は、通常の5'から3'への連結から逆転した連結（すなわち、5'から5'への連結または3'から3'への連結のいずれか）を有する塩基を指す。例えば：

【化6】



30

【0061】

脱塩基ヌクレオチドは、逆位連結により結合することができる。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'ヌクレオチドへと結合される場合があり、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'ヌクレオチドへと結合される場合がある。末端部の5'または3'のいずれかのヌクレオチドにおける逆位脱塩基ヌクレオチドも、逆位脱塩基末端キャップと呼ばれる場合がある。本出願において、「invd」という用語は、逆位脱塩基ヌクレオチド連結を指し示す。

40

【0062】

上記修飾およびそれらの同等物は、本明細書に記載される実施形態の範囲内に包含される。

【0063】

2. ガイドRNA組成物

ガイドRNAを含む組成物が包含される。一部の実施形態では、ガイドRNAはtrRNAを含む。一部の実施形態では、ガイドRNAはcrRNAを含む。一部の実施形態では、ガイドRNAはcrRNAおよびtrRNAを含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、sgRNAとして1つのRNA分子上にcrRNAおよびtrRNAを含む。一部の実施形態では、ガイドRNAは、dgRNAとして2つのRNA分子上にcrRNA

50

および t r R N A を含む。d g R N A において、2 つの R N A 分子は塩基対形成を介して会合してもよい。

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態では、ガイド R N A は 5 ' 終端領域を含む。一部の実施形態では、ガイド R N A は 5 ' 終端領域を含まない。一部の実施形態では、5 ' 終端領域は、s g R N A について（但し、本明細書においては全てのガイド R N A に適用可能である）Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333-339 (2014)に記載される「スパーサー」領域を含む。一部の実施形態では、5 ' 終端領域は 5 ' 末端修飾を含む。スパーサー領域を有するまたは有しない 5 ' 終端領域は、c r R N A、t r R N A、s g R N A、および / または d g R N A と会合していてもよい。スパーサー領域は、時として本明細書においておよびその他により、「ガイド領域」、「ガイドドメイン」または「標的化ドメイン」とも称される。本明細書で使用される「標的配列」は、ガイド領域 / ドメインが切断のためにヌクレアーゼをそれに対して方向付ける核酸の配列を指す。一部の実施形態では、s p y C a s 9 タンパク質は、スパーサー領域中に存在するヌクレオチドにより標的核酸分子の標的配列にガイド領域 / ドメインにより方向付けられてもよい。一部の実施形態では、ガイド R N A はスパーサー領域を含まない。

【 0 0 6 5 】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるガイド R N A は、表 4 に示される配列のうちのいずれかを含むまたはそれからなる。しかしながら、配列がガイド / スパーサー領域を示す場合、組成物はこの領域を含んでもよく、または含まなくてもよいことを認識すべきであることに留意されたい。さらに、表 4 に示され、表 4 において配列番号により特定される配列のうちのいずれかの修飾を含むガイド R N A が包含される。すなわち、ヌクレオチドは同じであってもよく、または異なってもよいが、示される修飾パターンは表 4 のガイド配列の修飾パターンと同じであってもよく、または類似であってもよい。修飾パターンは、g R N A の修飾の相対位置および同一性または g R N A の領域（例えば、5 ' 終端領域、下部ステム領域、バルジ領域、上部ステム領域、ネクサス領域、ヘアピン 1 領域、ヘアピン 2 領域、3 ' 終端領域）を含む。一部の実施形態では、修飾パターンは、表 4 の配列欄に示される配列のうちのいずれか 1 つの修飾、または該配列の 1 つもしくは複数の領域にわたる修飾の少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % を含有する。一部の実施形態では、修飾パターンは、表 4 の配列欄に示される配列のうちのいずれか 1 つの修飾パターンに対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一である。一部の実施形態では、修飾パターンは、表 4 に示される配列の 1 つまたは複数の領域、例えば、5 ' 終端領域、下部ステム領域、バルジ領域、上部ステム領域、ネクサス領域、ヘアピン 1 領域、ヘアピン 2 領域、および / または 3 ' 終端領域にわたって少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一である。例えば、一部の実施形態では、修飾パターンが 5 ' 終端領域にわたる配列の修飾パターンに対して少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一であるガイド R N A が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンが下部ステムにわたって少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一であるガイド R N A が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンがバルジにわたって少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一であるガイド R N A が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンが上部ステムにわたって少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および 9 9 % 同一であるガイド R N A が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンがネクサスにわたって少なくとも 5 0 %、5 5 %、6 0 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、およ

び 99% 同一であるガイド RNA が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンがヘアピン 1 にわたって少なくとも 50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、および 99% 同一であるガイド RNA が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンがヘアピン 2 にわたって少なくとも 50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、および 99% 同一であるガイド RNA が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンが 3' 終端にわたって少なくとも 50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、および 99% 同一であるガイド RNA が包含される。一部の実施形態では、修飾パターンは、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のヌクレオチドにおける、表 4 の配列、またはそのような配列の領域（例えば、5' 終端、下部ステム、バルジ、上部ステム、ネクサス、ヘアピン 1、ヘアピン 2、3' 終端）の修飾パターンとは異なる。一部の実施形態では、gRNA は、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のヌクレオチドにおける表 4 の配列の修飾とは異なる修飾を含む。一部の実施形態では、gRNA は、0 個、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、または 6 個のヌクレオチドにおける表 4 の配列の領域（例えば、5' 終端、下部ステム、バルジ、上部ステム、ネクサス、ヘアピン 1、ヘアピン 2、3' 終端）の修飾とは異なる修飾を含む。

10

【0066】

一部の実施形態では、gRNA は 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、gRNA は 2' - O - (2 - メトキシエチル) (2' - O - moe) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、gRNA は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、gRNA はヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含む。

20

【0067】

一部の実施形態では、gRNA は、5' 末端修飾、3' 末端修飾、または 5' 末端修飾および 3' 末端修飾を含む。一部の実施形態では、5' 末端修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含む。一部の実施形態では、5' 末端修飾は、2' - O - メチル (2' - O - Me)、2' - O - (2 - メトキシエチル) (2' - O - moe)、および/または 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、5' 末端修飾は、少なくとも 1 つのホスホロチオエート (PS) 結合と、2' - O - メチル (2' - O - Me)、2' - O - (2 - メトキシエチル) (2' - O - moe)、および/または 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドのうちの 1 つまたは複数と、を含む。末端修飾は、ホスホロチオエート (PS)、2' - O - メチル (2' - O - Me)、2' - O - (2 - メトキシエチル) (2' - O - moe)、および/または 2' - フルオロ (2' - F) 修飾を含んでもよい。同等の末端修飾もまた本明細書に記載される実施形態に包含される。一部の実施形態では、gRNA は、gRNA の 1 つまたは複数の領域の修飾と組み合わせて末端修飾を含む。

30

【0068】

A. sgRNA の組成物

一部の実施形態では、本発明の組成物および方法は、Cas9 などのヌクレアーゼを標的 DNA 配列に方向付ける crRNA および trRNA を含む gRNA を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される gRNA は 1 つの RNA 分子 (シングルガイド RNA または sgRNA) 上に会合していてもよい。

40

【0069】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号 228 ~ 332 に記載される配列のうちのいずれか 1 つを含むまたはそれからなる sgRNA を含む。

【0070】

一部の実施形態では、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 の修飾配列のうちのいずれか 1 つを含む sgRNA が提供される。一部の実施形態では、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 の修飾配列のうちの

50

いずれか1つを含むsgRNAであって、標的配列に相補的であり、かつCas9をその切断のための標的に方向付ける5'「スペーサー」配列（「ガイド配列」）をさらに含むsgRNAが包含される。一部の事例では、本発明は、配列番号235～240、265～285、および309～329のいずれか1つの核酸に対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一であるsgRNAを含む。

【0071】

1. sgRNAのドメイン

Briner AE et al., Molecular Cell 56: 333-339 (2014)には、標的化に関与する「スペーサー」ドメイン、「下部ステム」、「バルジ」、「上部ステム」（テトラループを含む場合がある）、「ネクサス」、ならびに「ヘアピン1」ドメインおよび「ヘアピン2」ドメインなどのsgRNAの機能性ドメイン（本明細書において「ドメイン」と称される）が記載されている。Briner et al., 第334頁、図1Aを参照のこと。

【0072】

表1および図21Aは、本明細書で使用されるsgRNAのドメインの説明を提供する。表1において、領域間の「n」は、可変数のヌクレオチド、例えば、0から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれより多くのヌクレオチドを表す。一部の実施形態では、nは0に等しい。一部の実施形態では、nは1に等しい。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1：s g RNAの領域 (直線表示、5' から 3' へ)

	LSI-6		BI-2		USI-12		B3-6	
	下部システム	n	バブルジ	n	上部システム	n	バブルジ	n
5' 終端(n)								

(下記に続く)

LS7-12		N1-18		H1-1 から H1-12		H2-1 から H2-15		3' 終端
下部システム	n	ネクサス	n	ヘアピン 1	n	ヘアピン 2		

【 0 0 7 3 】

a) 5 終端領域

一部の実施形態では、s g RNAは、表 1 に示されるように 5' 終端においてヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、s g RNAの 5' 終端は、C a s タンパク質を標的ヌクレオチド配列へと方向付けるように機能するスペーサーまたはガイド領域を含む。一部の実施形態では、5' 終端はスペーサーまたはガイド領域を含まない。一部の実施形態では、5' 終端は、C a s タンパク質を標的ヌクレオチド領域へと方向付けるように機能しないスペーサーおよび追加のヌクレオチドを含む。

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、ガイド領域は、sgRNAの5'末端において最初の1~10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド領域は20ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド領域は、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、もしくは25個またはそれより多くのヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は17個のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は18個のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は19個のヌクレオチドを含んでもよい。

【0075】

一部の実施形態では、ガイド領域の選択は、編集のための対象の遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。例えば、一部の実施形態では、sgRNAは、対象の遺伝子の標的配列に相補的なガイド領域を含む。

【0076】

一部の実施形態では、対象の遺伝子中の標的配列はsgRNAのガイド領域に相補的であってもよい。一部の実施形態では、sgRNAのガイド領域と対象の遺伝子中のその対応する標的配列との相補性または同一性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。一部の実施形態では、sgRNAのガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は100%相補的または同一であってもよい。他の実施形態では、sgRNAのガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は少なくとも1つのミスマッチを含有してもよい。例えば、sgRNAのガイド領域および対象の遺伝子の標的配列は、標的配列の全長が少なくとも約17個、18個、19個、20個またはそれより多くの塩基対である場合、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のミスマッチを含有してよい。一部の実施形態では、sgRNAのガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は、ガイド配列が少なくとも約17個、18個、19個、20個またはそれより多くのヌクレオチドを含む場合、1~6個のミスマッチを含有してよい。一部の実施形態では、sgRNAのガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は、ガイド配列が約20個のヌクレオチドを含む場合、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のミスマッチを含有してよい。5'末端は、ガイド領域とは考えられない(すなわち、Cas9タンパク質を標的核酸に方向付けるように機能しない)ヌクレオチドを含んでもよい。

【0077】

b) 下部ステム

一部の実施形態では、sgRNAは、直線的に見た時にバルジおよび上部ステム領域により分離された下部ステム(LS)領域を含む。表1を参照のこと。

【0078】

一部の実施形態では、下部ステム領域は、1~12個のヌクレオチドを含み、例えば、一実施形態では、下部ステム領域はLS1~LS12を含む。一部の実施形態では、下部ステム領域は、表1および図21Aに示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、下部ステム領域は、表1および図21Aに示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。下部ステム領域が表1および図21Aの図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持されるべきである。

【0079】

一部の実施形態では、下部ステム領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、下部ステムの核酸配列における相補性は、sgRNA中のステムの二次構造に繋がる(例えば、該領域は互いに塩基対形成する場合がある)。一部の実施形態では、下部ステム領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい。

【0080】

10

20

30

40

50

c) バルジ

一部の実施形態では、s g R N A は、6 個のヌクレオチド B 1 ~ B 6 を含むバルジ領域を含む。直線的に見た時に、バルジ領域は 2 つの領域に分離される。表 1 を参照のこと。一部の実施形態では、バルジ領域は 6 個のヌクレオチドを含み、最初の 2 個のヌクレオチドには上部ステム領域が後続し、上部ステム領域にはバルジの最後の 4 個のヌクレオチドが後続する。一部の実施形態では、バルジ領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、バルジ領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。バルジ領域が表 1 および図 2 1 A の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持されるべきである。

10

【 0 0 8 1 】

一部の実施形態では、バルジの存在は、s g R N A 中の上部ステムモジュールと下部ステムモジュールとの間の方向性キックを結果としてもたらす。

【 0 0 8 2 】

d) 上部ステム

一部の実施形態では、s g R N A は、1 2 個のヌクレオチドを含む上部ステム領域を含む。一部の実施形態では、上部ステム領域はループ配列を含む。一部の事例では、ループはテトラループ (4 個のヌクレオチドからなるループ) である。

【 0 0 8 3 】

一部の実施形態では、上部ステム領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、上部ステム領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。上部ステム領域が表 1 および図 2 1 A の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持されるべきである。

20

【 0 0 8 4 】

一部の実施形態では、上部ステム領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、上部ステムの核酸配列における相補性は、s g R N A 中のステムの二次構造に繋がる (例えば、該領域は互いに塩基対形成する場合がある) 。一部の実施形態では、上部ステム領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい。

30

【 0 0 8 5 】

e) ネクサス

一部の実施形態では、s g R N A は、下部ステム領域とヘアピン 1 領域との間に位置するネクサス領域を含む。一部の実施形態では、ネクサスは 1 8 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ネクサス領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるように、ヌクレオチド N 1 から N 1 8 を含む。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、ネクサス領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ネクサス領域は、表 1 および図 2 1 A に示されるよりも多いヌクレオチドを含む。ネクサス領域が表 1 および図 2 1 A の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持されるべきである。

40

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、ネクサス領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、核酸配列における相補性は、s g R N A 中のステムおよび / またはステムループの二次構造に繋がる (例えば、ネクサス領域中のある特定のヌクレオチドは互いに塩基対形成する場合がある) 。一部の実施形態では、ネクサス領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい。

【 0 0 8 8 】

f) ヘアピン

50

一部の実施形態では、s g R N A は 1 つまたは複数のヘアピン領域を含む。一部の実施形態では、ヘアピン領域はネクサス領域の下流（例えば、3'）にある。一部の実施形態では、ネクサス領域のすぐ下流のヌクレオチドの領域は「ヘアピン 1」または「H 1」と称される。一部の実施形態では、ヘアピン 1 の 3' のヌクレオチドの領域は「ヘアピン 2」または「H 2」と称される。一部の実施形態では、ヘアピン領域はヘアピン 1 およびヘアピン 2 を含む。一部の実施形態では、s g R N A はヘアピン 1 またはヘアピン 2 のみを含む。

【0089】

一部の実施形態では、ヘアピン 1 領域は、ネクサス領域のすぐ下流の 12 個の核酸を含む。一部の実施形態では、ヘアピン 1 領域は、表 1 および図 21A に示されるように、ヌクレオチド H 1 - 1 から H 1 - 12 を含む。

【0090】

一部の実施形態では、ヘアピン 2 領域は、ヘアピン 1 領域の下流の 15 個の核酸を含む。一部の実施形態では、ヘアピン 2 領域は、表 1 および図 21A に示されるように、ヌクレオチド H 2 - 1 から H 2 - 15 を含む。

【0091】

一部の実施形態では、1 つまたは複数のヌクレオチドがヘアピン 1 領域とヘアピン 2 領域との間に存在する。ヘアピン 1 領域とヘアピン 2 領域との間の 1 つまたは複数のヌクレオチドは、修飾されていてもよく、または非修飾であってもよい。一部の実施形態では、ヘアピン 1 およびヘアピン 2 は、1 個のヌクレオチドにより分離されている。一部の実施形態では、ヘアピン領域は、表 1 および図 21A に示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ヘアピン領域は、表 1 および図 21A に示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。ヘアピン領域が表 1 および図 21A の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持されるべきである。

【0092】

一部の実施形態では、ヘアピン領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、ヘアピン領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい（例えば、ヘアピンのトップまたはループは、対形成していないヌクレオチドを含む）。

【0093】

一部の実施形態では、s g R N A は、ヌクレオチド「n」でのヘアピン 1 の置換を含み、「n」は、1 と、50、40、30、20、15、10、5、4、3、および 2 との間の整数である。一部の実施形態では、s g R N A のヘアピン 1 領域は 2 ヌクレオチドにより置換される。

【0094】

g) 3 終端領域

一部の実施形態では、s g R N A は、ヘアピン領域（複数可）の後にヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、例えば、ヘアピンの二次構造と会合しない 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、15 個もしくは 20 個またはそれより多くのヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない 1 個、2 個、3 個、または 4 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない 4 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない 1 個、2 個、または 3 個のヌクレオチドを含む。

【0095】

2. s g R N A の修飾

一部の実施形態では、本発明は、以下の領域：5' 終端におけるヌクレオチド；下部ステム領域；パルジ領域；上部ステム領域；ネクサス領域；ヘアピン 1 領域；ヘアピン 2 領域；および 3' 終端におけるヌクレオチドのうちの 1 つまたは複数内に 1 つまたは複数の修飾を含む s g R N A を含む。

10

20

30

40

50

【0096】

一部の実施形態では、修飾は2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-O-(2-メトキシエチル)(2'-O-moe)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート(PS)結合を含む。

【0097】

一部の実施形態では、sgRNAは、その5'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの1つ、2つ、3つ、または4つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の3個または4個のヌクレオチド、および3'末端における最後の3個または4個のヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチドと3'末端における最後の4個のヌクレオチドとはホスホロチオエート(PS)結合により連結されている。一部の実施形態では、修飾は2'-O-Meを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-Fを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-O-moeを含む。

10

【0098】

一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの1つ、2つ、3つ、または4つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3'末端における最初の4個のヌクレオチドのうちの1つ、2つ、3つ、または4つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5'末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の3個のヌクレオチドは2'-O-Meまたは2'-O-moe修飾を含む。

20

【0099】

一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5'末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の3個のヌクレオチドは2'-F修飾を含む。

【0100】

一部の実施形態では、LS1、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12が2'-O-Meで修飾されているsgRNAが提供される。一部の実施形態では、sgRNAのバルジ領域中のヌクレオチドのそれぞれは2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、sgRNAの上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれは2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、sgRNAのネクサス領域中のN16、N17、およびN18は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、sgRNAのヘアピン1領域中のヌクレオチドのそれぞれは2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、sgRNAのヘアピン2領域中のヌクレオチドのそれぞれは2'-O-Meで修飾されている。

30

【0101】

一部の実施形態では、sgRNAは、以下のヌクレオチド：5'末端における最初の3個のヌクレオチド；LS1、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12；バルジ領域中のB1およびB2；sgRNAの上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれ；ネクサス領域中のN16、N17、およびN18；ヘアピン1領域中のヌクレオチドのそれぞれ；ヘアピン2領域中のヌクレオチドのそれぞれ；および3'末端における最後の4個のヌクレオチドにおいて2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む。

40

【0102】

一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNAは、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおいて2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸、お

50

よび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾核酸をさらに含む。一部の実施形態では、LS 9 および LS 10 は 2' - F で修飾されている。一部の実施形態では、N 15、N 16、N 17、および N 18 は 2' - F で修飾されている。一部の実施形態では、H 2 - 9、H 2 - 10、H 2 - 11、H 2 - 12、H 2 - 13、H 5 - 14、および H 2 - 15 は 2' - F で修飾されている。一部の実施形態では、3' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドは 2' - F で修飾されている。

【0103】

一部の実施形態では、以下のヌクレオチド：下部ステム領域中の LS 9 および LS 10；ネクサス領域中の N 15、N 16、N 17、および N 18；ならびにヘアピン 2 領域中の H 2 - 9、H 2 - 10、H 2 - 11、H 2 - 12、H 2 - 13、H 5 - 14、および H 2 - 15 において 2' - F 修飾核酸を含むシングルガイド RNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNA は、3' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおいて 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNA は、5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾核酸をさらに含み、かつ 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドのうちの 3 つにおける 2' - O - Me または 2' - F 修飾核酸をさらに含む。

【0104】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、LS 1 および LS 6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイド RNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNA は、5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む。

【0105】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、LS 1 ~ LS 6 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「n」における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイド RNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNA は、5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む。

【0106】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、LS 2 ~ LS 5 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、LS 1 および LS 6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の「n」において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングル

ガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

【0107】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS7、LS8、LS11、およびLS12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の「n」における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H2-1~H2-15における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

10

【0108】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS8、LS10、およびLS12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS7、LS9、およびLS11における2'-O-F修飾ヌクレオチドと、H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H2-1~H2-15における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

20

【0109】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS1、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H2-1~H2-15における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

30

【0110】

一部の実施形態では、5' 終端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS1、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、LS9およびLS10における2'-F修飾ヌクレオチドと、US1~US12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H1-1~H1-12における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、H2-1~H2-15における2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の4個のヌクレオチドにおける2'-O-Me修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

40

【0111】

50

一部の実施形態では、5' 末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、US 1 ~ US 12における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 1 ~ H 1 - 12における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 1 ~ H 2 - 8における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 9 ~ H 2 - 15における2' - F 修飾ヌクレオチドと、3' 末端における最後から2つ目、最後から3つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドにおける2' - F 修飾ヌクレオチドと、3' 末端における最後のヌクレオチドにおける2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

10

【0112】

一部の実施形態では、5' 末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、US 1 ~ US 12における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 10、およびH 1 - 12における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、およびH 1 - 11における2' - F 修飾ヌクレオチドと、ヘアピン1とヘアピン2との間の2' - F 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 10、H 2 - 12、およびH 2 - 14における2' - F 修飾ヌクレオチドと、H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 11、H 2 - 13、およびH 2 - 15における2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、3' 末端における最後から2つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドにおける2' - F 修飾ヌクレオチドと、3' 末端における最後から3つ目、および最後のヌクレオチドにおける2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

20

【0113】

一部の実施形態では、ヌクレオチドLS 8、LS 10、LS 12、H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 10、H 1 - 12、H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 11、H 2 - 13、およびH 2 - 15において2' - O - Me 修飾を含み、かつLS 7、LS 9、LS 11；H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、H 1 - 11、H 1 - 13、H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 10、H 2 - 12、およびH 2 - 14において2' - F 修飾を含むシングルガイドRNA (sgRNA) が本明細書に開示される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および3' 末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、sgRNAは、3' 末端における最後および最後から3つ目のヌクレオチドにおいて2' - O - Me 修飾ヌクレオチドをさらに含む、かつ3' 末端における最後から2つ目および最後から3つ目のヌクレオチドにおいて2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む。

30

40

【0114】

一部の実施形態では、配列番号228 ~ 232のうちのいずれか1つの核酸を含むsgRNAが本明細書に開示される。一部の実施形態では、配列番号235 ~ 240、265 ~ 285、および309 ~ 329のうちのいずれか1つの核酸を含むsgRNAが本明細書に開示される。一部の実施形態では、配列番号235 ~ 240、265 ~ 285、および309 ~ 329のうちのいずれか1つの核酸に対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、sgRNAが本明細書に開示される。一部の実施形態では、sgRNAは、5' 末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート (PS) 結合および

50

3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む。

【0115】

一部の実施形態では、5' 末端修飾と、上部ステム領域；ヘアピン 1 領域；およびヘアピン 2 領域のうちの 1 つまたは複数における 1 つまたは複数の修飾と、を含む s g R N A が提供され、5' 末端修飾は、5' 終端の最初の 7 個のヌクレオチド内に少なくとも 2 つのホスホロチオエート連結を含む。

【0116】

一部の実施形態では、5' 末端修飾と、上部ステム領域；ヘアピン 1 領域；およびヘアピン 2 領域のうちの 1 つまたは複数における 1 つまたは複数の修飾と、を含む s g R N A が提供され、5' 末端修飾は、R N A の 5' 末端において 1 つまたは複数のホスホロチオエート連結を含む。一部の実施形態では、1 つまたは複数のホスホロチオエート結合 (phorp horothioate bonds) は、5' 終端のヌクレオチドを連結する。

10

【0117】

一部の実施形態では、5' 末端修飾と、上部ステム領域；ヘアピン 1 領域；およびヘアピン 2 領域の 1 つまたは複数において 1 つまたは複数の修飾と、を含む s g R N A が提供され、5' 末端修飾は、5' 終端の最初の 7 個のヌクレオチド内に 1 つまたは複数のホスホロチオエート連結を含む。

【0118】

一部の実施形態では、配列番号 228 ~ 332 の修飾 s g R N A 配列のうちのいずれか 1 つを含む s g R N A が提供される。

20

【0119】

一部の実施形態では、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 の修飾 s g R N A 配列のうちのいずれか 1 つを含むまたはそれからなる s g R N A が提供される。

【0120】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 の修飾配列のうちのいずれか 1 つを含む s g R N A を含み、s g R N A は、標的配列に少なくとも部分的に相補的であり、かつ C a s 9 をその標的に切断のために方向付ける 5' スペースー配列をさらに含む。

【0121】

30

一部の実施形態では、本発明は、配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチドに対して少なくとも 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70% の同一性を有するヌクレオチドを含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、s g R N A を含む。すなわち、ヌクレオチド A、U、C、および G は、配列に示されるものと比較して 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70% 異なってもよいが、修飾は変更しないままである。

【0122】

一部の実施形態では、本発明は、以下の領域：5' 終端におけるヌクレオチド；下部ステム領域；パルジ領域；上部ステム領域；ネクサス領域；ヘアピン 1 領域；ヘアピン 2 領域；および 3' 終端におけるヌクレオチドのうちの 1 つまたは複数内に 1 つまたは複数の修飾を含む s g R N A を含む。

40

【0123】

一部の実施形態では、修飾は 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート (P S) 結合を含む。一部の実施形態では、修飾は逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。

【0124】

一部の実施形態では、5' 終端中の最初の 3 個のヌクレオチドと、下部ステム中の L S 1

50

、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12と、バルジ領域中のB1およびB2と、上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれと、ネクサス領域中のN16、N17、およびN18と、ヘアピン1領域中のヌクレオチドのそれぞれと、ヘアピン1とヘアピン2との間の1個のヌクレオチドと、ヘアピン2領域中のヌクレオチドのそれぞれと、3'末端における最後の4個のヌクレオチドと、において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含んで、sgRNAが提供される。一実施形態では、sgRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドの間の3つのPS結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドの間の3つのPS結合をさらに含む。

【0125】

一部の実施形態では、5'末端中の最初の3個のヌクレオチドと、下部ステム中のLS1、LS6、LS7、LS8、LS11、およびLS12と、バルジ領域中のB1～B6と、上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれと、ネクサス領域中のN16、N17、およびN18と、ヘアピン1領域中のヌクレオチドのそれぞれと、ヘアピン1とヘアピン2との間の1個のヌクレオチドと、ヘアピン2領域中のヌクレオチドのそれぞれと、3'末端における最後の4個のヌクレオチドと、において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含んで、sgRNAが提供される。一実施形態では、sgRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドの間の3つのPS結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドの間の3つのPS結合をさらに含む。

【0126】

一部の実施形態では、下部ステム中のLS9およびLS10と、ネクサス領域中の15～N18と、ヘアピン2領域中のH2-9～HS-15と、3'末端領域中の最後から2つ目、最後から3つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドと、において2'-F修飾ヌクレオチドを含んで、sgRNAが提供される。

【0127】

一部の実施形態では、下部ステム中の各ヌクレオチドと、ネクサス領域中の15～N18と、ヘアピン2領域中のH2-9～HS-15と、3'末端領域中の最後から2つ目、最後から3つ目、および最後から4つ目のヌクレオチドと、において2'-F修飾ヌクレオチドを含んで、sgRNAが提供される。

【0128】

一部の実施形態では、LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13、H2-15と、3'末端における最後および最後から3つ目のヌクレオチドと、において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含み、かつLS7、LS9、LS11、H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12、H2-14と、3'末端における最後から2つ目および最後から4つ目のヌクレオチドと、において2'-F修飾を含んで、シングルガイドRNA (sgRNA) が提供される。

【0129】

以下の実施形態のそれぞれが包含される：

実施形態01。

シングルガイドRNA (sgRNA) であって、以下の領域：

- a. 5'末端と、
- b. 下部ステム領域と、
- c. バルジ領域と、
- d. 上部ステム領域と、
- e. ネクサス領域と、
- f. ヘアピン1領域と、
- g. ヘアピン2領域と、
- h. 3'末端と、うちの1つまたは複数において1つまたは複数の修飾を含む、sgRNA。

10

20

30

40

50

実施形態 0 2 .

修飾が 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 1 の s g R N A。

実施形態 0 3 .

修飾が 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 1 の s g R N A。

実施形態 0 4 .

修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (P S) 結合を含む、実施形態 1 の s g R N A。

実施形態 0 5 .

5' 終端における最初の 3 個または 4 個のヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 3 個または 4 個のヌクレオチドが修飾されている、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つの s g R N A。

10

実施形態 0 6 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (P S) 結合により連結されている、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 0 7 .

修飾が 2' - O - Me を含む、実施形態 5 の s g R N A。

実施形態 0 8 .

修飾が 2' - F を含む、実施形態 5 の s g R N A。

20

実施形態 0 9 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 0 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - F 修飾を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つの s g R N A。

30

実施形態 1 1 .

L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 が 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 2 .

バルジ領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 1 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 3 .

上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 2 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 4 .

ネクサス領域中の N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つの s g R N A。

40

実施形態 1 5 .

ヘアピン 1 領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 6 .

ヘアピン 2 領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 5 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 1 7 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、以下のヌクレオチド：

50

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドと、
b . 下部ステム領域中の L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2
領域と、
c . バルジ領域中の B 1 および B 2 と、
d . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、
e . ネクサス領域中の N 1 6、N 1 7、および N 1 8 と、
f . ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、
g . ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、
h . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドと、において 2 ' - O - M e 修飾核酸を
含む、s g R N A。

10

実施形態 1 8 .

B 3 ~ B 6 が 2 ' - O - M e で修飾されている、実施形態 1 7 の s g R N A。

実施形態 1 9 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S)
結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさら
に含む、実施形態 1 7 の s g R N A。

実施形態 2 0 .

L S 9 および L S 1 0 が 2 ' - F で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか 1 つの
s g R N A。

実施形態 2 1 .

20

N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が 2 ' - F で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 0
および 2 0 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 2 2 .

H 2 - 9、H 2 - 1 0、H 2 - 1 1、H 2 - 1 2、H 2 - 1 3、H 2 - 1 4、および H
2 - 1 5 が 2 ' - F で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 0 および 2 0 ~ 2 1 のいずれか 1 つ
の s g R N A。

実施形態 2 3 .

3 ' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチ
ドが 2 ' - F で修飾されている、実施形態 1 ~ 1 0 および 2 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つの s g
R N A。

30

実施形態 2 4 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、以下の位置：

a . 下部ステム領域中の L S 9 および L S 1 0 と、
b . ネクサス領域中の N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 と、
c . ヘアピン 2 領域中の H 2 - 9、H 2 - 1 0、H 2 - 1 1、H 2 - 1 2、H 2 - 1 3
、H 2 - 1 4、および H 2 - 1 5 と、において 2 ' - F 修飾ヌクレオチドを含む、シングル
ガイド R N A (s g R N A)。

実施形態 2 5 .

3 ' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチ
ドにおいて 2 ' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態 2 4 の s g R N A。

40

実施形態 2 6 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S)
結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさら
に含む、実施形態 2 4 または 2 5 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 2 7 .

5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2 ' - O - M e または 2 ' - F 修飾ヌ
クレオチドをさらに含み、かつ 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドの 3 つにおいて
2 ' - O - M e または 2 ' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態 2 4 ~ 2 6 のいづ
れか 1 つの s g R N A。

実施形態 2 8 .

50

シングルガイドRNA (sgRNA) であって、

- a. 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. LS1 および LS6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- c. US1 ~ US12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- d. H1 - 1 ~ H1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- e. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- f. H2 - 1 ~ H2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- g. 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

10

実施形態 29.

5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、実施形態 28 の sgRNA。

実施形態 30.

シングルガイドRNA (sgRNA) であって、

- a. 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. LS1 ~ LS6 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
- c. US1 ~ US12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- d. H1 - 1 ~ H1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- e. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- f. H2 - 1 ~ H2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- g. 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

20

実施形態 31.

5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、実施形態 30 の sgRNA。

実施形態 32.

30

シングルガイドRNA (sgRNA) であって、

- a. 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. LS2 ~ LS5 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、
- c. LS1 および LS6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- d. US1 ~ US12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- e. H1 - 1 ~ H1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- f. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- g. H2 - 1 ~ H2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- h. 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、シングルガイドRNA (sgRNA)。

40

実施形態 33.

5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、実施形態 32 の sgRNA。

実施形態 34.

シングルガイドRNA (sgRNA) であって、

- a. 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. US1 ~ US12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

50

c . L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

g . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

実施形態 3 5 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 3 4 の s g R N A。

10

実施形態 3 6 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . L S 9 および L S 1 0 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

20

f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

h . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

実施形態 3 7 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 3 6 の s g R N A。

実施形態 3 8 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

30

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 8、L S 1 0、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . L S 7、L S 9、および L S 1 1 における 2 ' - O - F 修飾ヌクレオチドと、

e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

h . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

40

実施形態 3 9 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 3 2 の s g R N A。

実施形態 4 0 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

50

c . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 d . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 f . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 g . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

実施形態 4 1 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 4 0 の s g R N A。

10

実施形態 4 2 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 b . L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 c . L S 9 および L S 1 0 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、
 d . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 h . 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

20

実施形態 4 3 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 4 3 の s g R N A。

実施形態 4 4 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 c . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 d . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 e . H 2 - 1 ~ H 2 - 8 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 f . H 2 - 9 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、
 g . 3 ' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、
 h . 3 ' 終端における最後のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

40

実施形態 4 5 .

5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 4 4 の s g R N A。

実施形態 4 6 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、
 c . H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 1 0、および H 1 - 1 2 におけ

50

る 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d . H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、および H 1 - 11 における

2' - F 修飾ヌクレオチドと、

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 10、H 2 - 12 ; および H 2 - 14 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 11 ; H 2 - 13、および H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h . 3' 終端における最後から 2 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

i . 3' 終端における最後から 3 つ目、および最後のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

10

実施形態 47 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 46 の s g R N A。

実施形態 48 .

シングルガイド R N A (s g R N A) であって、

a . 2' - O - Me 修飾ヌクレオチド L S 8、L S 10、L S 12、H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 10、H 1 - 12、H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 11、H 2 - 13、および H 2 - 15 と、

20

b . L S 7、L S 9、L S 11、H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、H 1 - 11、H 1 - 13、H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 10、H 2 - 12、および H 2 - 14 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g R N A。

実施形態 49 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 48 の s g R N A。

実施形態 50 .

a . 3' 終端における最後および最後から 3 つ目のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

30

b . 3' 終端における最後から 2 つ目および最後から 3 つ目のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドと、をさらに含む、実施形態 48 ~ 49 のいずれか 1 つの s g R N A。

実施形態 51 .

配列番号 228 ~ 332 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む、s g R N A。

実施形態 52 .

配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む、s g R N A。

実施形態 53 .

40

配列番号 235 ~ 240、265 ~ 285、および 309 ~ 329 のうちのいずれか 1 つの核酸に対して少なくとも 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70 % の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、s g R N A。

実施形態 54 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 51 ~ 53 のいずれか 1 つの s g R N A。

【 0130 】

B . d g R N A の組成物

50

一部の実施形態では、本発明の組成物および方法は、Cas9などのヌクレアーゼを標的DNA配列に方向付けるcrRNAおよびtrRNAを含むgRNAを含む。一部の実施形態では、gRNAは会合しているが、2つの別々のRNA分子(デュアルガイドRNAまたはdgRNA)上にある。

【0131】

表2および図21Cは、本明細書で使用するcrRNAのドメインの説明を提供する。5'末端領域は、crRNAの5'末端においてまたはその近くにスペーサー領域を含む場合があり、かつCas9を、例えば、本明細書に記載されるDNA中の標的領域に方向付けるように機能する場合がある。表2では、領域間の「n」は、可変の数、例えば、0個から1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれより多くのヌクレオチドを表す。一部の実施形態では、nは0に等しい。本明細書に記載される任意のdgRNAは、任意のドメイン間の「n」を含み得る。

10

【0132】

表3および図21Cは、本明細書で使用するtrRNAのドメインの説明を提供する。表3では、領域間の「n」は、可変の数、例えば、0個から1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、またはそれより多くのヌクレオチドを表す。一部の実施形態では、nは0に等しい。本明細書に記載される任意のdgRNAは、任意のドメイン間の「n」を含み得る。

20

【0133】

1. dgRNAのドメイン

Briner 2014に記載される通り、dgRNAは、標的化に関与するスペーサードメイン、下部ステムドメイン、パルジドメイン、上部ステムドメイン、ネクサスドメイン、およびヘアピンドメインなどが挙げられる、本明細書において「ドメイン」と称される特定の機能性ドメインに基づいて開発することができる。dgRNAにおいて、crRNAはgRNAの一部の構成成分を含み、かつ、trRNAはgRNAの一部の構成成分を含む。

【0134】

crRNAの領域を表2および図21Cに提供する。trRNAの領域を表3および図21Cに提供する。図21Cは例示的なdgRNAの図式を示す。

30

40

50

【表 3】

表 2：c r RNA の領域 (直線表示、5' から 3' へ)

	LS1-6		B1-2		US1-14	
5' 終端 (n)	下部システム	n	バルジ	n	上部システム	3' 終端

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3 : t r R N A の領域 (直線表示、5' から 3' へ)		USI-11		BI-4	LSI-6		N1-18		H1-1 から H1-12		H2-1 から H2-15	
	5' 終端 (n)	上部スデム	n	バルジ	n	下部スデム	n	ネクサス	n	ヘアピン 1	n	ヘアピン 2
												3' 終端

10

20

30

40

【 0 1 3 5 】

a) 5' 終端領域

一部の実施形態では、d g R N A は、表 2 ~ 3 および図 2 1 C に示されるように、c r R N A および t r R N A の 5' 終端においてヌクレオチドを含む。

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、c r R N A の 5' 終端は、C a s タンパク質を標的ヌクレオチド配列に方向付けるように機能するスペーサーまたはガイド領域を含む。一部の実施形態では、5' 終端はスペーサーまたはガイド領域を含まない。一部の実施形態では、5' 終端は、C a s タンパク質を標的ヌクレオチド領域に方向付けるように機能しないスペーサーおよ

10

20

30

40

50

び追加のヌクレオチドを含む。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、ガイド領域は、*c r R N A*の5'末端において最初の1～10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド領域は20個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ガイド領域は、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、もしくは25個またはそれより多くのヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は17個のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は18個のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、ガイド領域は19個のヌクレオチドを含んでもよい。

10

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、ガイド領域の選択は、編集のための対象の遺伝子内の標的配列に基づいて決定される。例えば、一部の実施形態では、*c r R N A*は、対象の遺伝子の標的配列に相補的なガイド領域を含む。

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態では、対象の遺伝子中の標的配列は、*c r R N A*のガイド領域に対して相補的であってもよい。一部の実施形態では、*c r R N A*のガイド領域と対象の遺伝子中のその対応する標的配列との相補性または同一性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。一部の実施形態では、*c r R N A*のガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は100%相補的または同一であってもよい。他の実施形態では、*c r R N A*のガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は少なくとも1つのミスマッチを含有してもよい。例えば、*c r R N A*のガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は、標的配列の全長が少なくとも約17個、18個、19個、20個またはそれより多くの塩基対である場合、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、または10個のミスマッチを含有してもよい。一部の実施形態では、*c r R N A*のガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は、ガイド配列が少なくとも約17個、18個、19個、20個またはそれより多くのヌクレオチドを含む場合、1～6個のミスマッチを含有してよい。一部の実施形態では、*c r R N A*のガイド領域および対象の遺伝子の標的領域は、ガイド配列が約20個のヌクレオチドを含む場合、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のミスマッチを含有してよい。

20

30

【 0 1 4 0 】

一部の実施形態では、*t r R N A*は5'末端を含む。一部の実施形態では、*t r R N A*は、*d g R N A*の上部ステムを部分的に形成する5'末端を含む。*t r R N A*の5'末端は標的遺伝子の領域に対して相補的ではない。

【 0 1 4 1 】

b) 下部ステム

一部の実施形態では、*d g R N A*は下部ステム(LS)領域を含む。下部ステム領域は、図21Cに描写されるように会合する*c r R N A*下部ステム領域および*t r R N A*下部ステム領域を含む。一部の実施形態では、*c r R N A*の下部ステム領域は*t r R N A*の下部ステム領域に対して少なくとも部分的に相補的である。一部の実施形態では、*c r R N A*の下部ステム領域は*t r R N A*の下部ステム領域に対して全体的に相補的である。

40

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、*c r R N A*および*t r R N A*の下部ステム領域はそれぞれ6個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*および*t r R N A*の下部ステム領域はそれぞれ、表2および表3ならびに図21Cに示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、下部ステム領域は、表2および表3ならびに図21Cに示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。下部ステム領域が表2および表3ならびに図21Cの図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかな

50

ように、修飾パターンは維持される。一部の実施形態では、*c r R N A*の下部ステム中のヌクレオチドの数は、*t r R N A*の下部ステム中のヌクレオチドの数とは異なる。

【 0 1 4 3 】

c) バルジ

一部の実施形態では、*d g R N A*はバルジ (B) 領域を含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は1つのバルジ領域を含み、かつ *t r R N A*は1つのバルジ領域を含む。一部の実施形態では、各バルジ領域は1 ~ 4 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*のバルジ領域は2 個のヌクレオチドを含み、かつ、*t r R N A*のバルジ領域は4 個のヌクレオチドを含む。

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態では、*c r R N A*のバルジ領域は、*c r R N A*の下部ステム領域と上部ステム領域との間に位置する。一部の実施形態では、*c r R N A*のバルジ領域は2 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*のバルジ領域は、表 2 および図 2 1 C に示されるように、ヌクレオチド B 1 および B 2 を含む。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、*t r R N A*のバルジ領域は、*t r R N A*の上部ステム領域と下部ステム領域との間に位置する。一部の実施形態では、*t r R N A*のバルジ領域は4 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*t r R N A*のバルジ領域は、表 3 および図 2 1 C に示されるように、ヌクレオチド B 1 から B 4 を含む。

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、バルジの存在は、*d g R N A*中の上部ステムモジュールと下部ステムモジュールとの間の方向性キックを結果としてもたらず。*c r R N A*のバルジおよび *t r R N A*のバルジは部分的に相補的であってもよい。*c r R N A*のバルジおよび *t r R N A*のバルジは相補性を有しなくてもよい。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、*c r R N A*および *t r R N A*のバルジ領域は、表 2 および表 3 ならびに図 2 1 C に示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。バルジ領域が表 2 および表 3 ならびに図 2 1 C の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持される。一部の実施形態では、*c r R N A*のバルジ中のヌクレオチドの数は、*t r R N A*のバルジ中のヌクレオチドの数とは異なる。

【 0 1 4 8 】

d) 上部ステム

一部の実施形態では、*d g R N A*は上部ステム (U S) 領域を含む。上部ステム領域は、図 2 1 C に描写されるように会合する *c r R N A*上部ステム領域および *t r R N A*上部ステム領域を含む。一部の実施形態では、*c r R N A*の上部ステム領域は、*t r R N A*の上部ステム領域に対して少なくとも部分的に相補的である。一部の実施形態では、*c r R N A*の上部ステム領域は、*t r R N A*の上部ステム領域に対して全体的に相補的である。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態では、*c r R N A*の上部ステム領域は1 4 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*t r R N A*の上部ステム領域は1 1 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*および *t r R N A*の上部ステム領域はそれぞれ、表 2 および表 3 ならびに図 2 1 C に示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*および *t r R N A*の上部ステム領域は、表 2 および表 3 ならびに図 2 1 C に示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。上部ステム領域が表 2 および表 3 ならびに図 2 1 C の図式に示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持される。

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、*c r R N A*の上部ステムは、表 2 および図 2 1 C に示されるように、ヌクレオチド U S 1 から U S 1 4 を含む。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、 $t r R N A$ の上部ステムは、表3および図21Cに示されるように、ヌクレオチドUS1からUS11を含む。

【0152】

e) ネクサス

一部の実施形態では、 $d g R N A$ はネクサス領域を含む $t r R N A$ を含む。一部の実施形態では、ネクサスは、 $t r R N A$ の下部ステム領域とヘアピン1領域との間にある。一部の実施形態では、ネクサスは、 $t r R N A$ の下部ステムのすぐ下流に位置する。一部の実施形態では、ネクサスは18個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のネクサス領域は、表3および図21Cに示されるように、ヌクレオチドN1~N18を含む。一部の実施形態では、ネクサスは、表3および図21Cに示されるよりも少ないヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のネクサス領域は、表3および図21Cに示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。ネクサス領域が表3および図21Cに示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明かなように、修飾パターンは維持される。

10

【0153】

一部の実施形態では、ネクサス領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、核酸配列中の相補性は、 $s g R N A$ 中のステムおよび/またはステムループの二次構造に繋がる(例えば、ネクサス領域中のある特定のヌクレオチドは互いに塩基対形成する場合がある)。一部の実施形態では、ネクサス領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい。

20

【0154】

f) ヘアピン

一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン領域はネクサス領域の下流にある。一部の実施形態では、ネクサス領域のすぐ下流のヌクレオチドの領域は「ヘアピン1」と称される。一部の実施形態では、ヘアピン1領域のすぐ下流のヌクレオチドの領域は「ヘアピン2」と称される。一部の実施形態では、ヘアピン領域はヘアピン1およびヘアピン2を含む。一部の事例では、ヘアピン1およびヘアピン2は、1つまたは複数のヌクレオチド「n」により分離されている。一部の実施形態では、 $n = 1$ である。一部の実施形態では、 $t r R N A$ はヘアピン1またはヘアピン2のみを含む。

【0155】

2個のヌクレオチドによる $t r R N A$ のヘアピン1領域の置換は、 $C a s R N P$ の編集活性を可能とすることが示されている(米国特許公開第20150376586号、図16を参照のこと)。一部の実施形態では、 $t r R N A$ はヌクレオチド「n」によるヘアピン1の置換を含み、「n」は、1と50、40、30、20、15、10、5、4、3、および2との間の整数である。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン1領域は2個のヌクレオチドにより置換されている。

30

【0156】

一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン1は、ネクサス領域のすぐ下流の12個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン1領域は、表3および図21Cに示されるように、ヌクレオチドH1-1からH1-12を含む。

40

【0157】

一部の実施形態では、非ヘアピンヌクレオチドが $t r R N A$ のヘアピン1領域とヘアピン2領域との間に存在する。一部の実施形態では、1~2個の非ヘアピンヌクレオチドがヘアピン1とヘアピン2との間に存在する。

【0158】

一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン2はヘアピン1の後(3')に15個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン2領域は、表3および図21Cに示されるように、ヌクレオチドH2-1からH2-15を含む。一部の実施形態では、 $t r R N A$ のヘアピン2領域は、表3に示されるように、ヌクレオチドH2-1からH2-15を含み、かつ、ヘアピン1とヘアピン2との間の「n」は1または2である。

50

【0159】

一部の実施形態では、t r R N A のヘアピン領域は、表3および図21Cに示されるよりも多くのヌクレオチドを含む。ヘアピン領域が表3および図21Cに示されるよりも少ないまたは多いヌクレオチドを含む場合、当業者に明らかなように、修飾パターンは維持される。

【0160】

一部の実施形態では、ヘアピン領域は、反対方向に読まれた時に核酸配列が相補的なヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、ヘアピン領域は、反対方向に読まれた時に互いに完全には相補的でなくてもよい（例えば、ヘアピンのトップまたはループは対形成していないヌクレオチドを含む）。

10

【0161】

一部の実施形態では、t r R N A はヌクレオチド「n」によるヘアピン1の置換を含み、「n」は、1と50、40、30、20、15、10、5、4、3、および2との間の整数である。一部の実施形態では、t r R N A のヘアピン1領域は2ヌクレオチドにより置換されている。

【0162】

g) 3' 終端

一部の実施形態では、d g R N A は、ヘアピン領域（複数可）の後（3'）に追加のヌクレオチドを含む3' 終端領域を含むt r R N A を含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、15個もしくは20個またはそれより多くのヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない1個、2個、3個、または4個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない4個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、3' 終端領域は、ヘアピンの二次構造と会合しない1個、2個、または3個のヌクレオチドを含む。

20

【0163】

2. d g R N A の修飾

一部の実施形態では、d g R N A は修飾c r R N A および非修飾t r R N A を含む。一部の実施形態では、d g R N A は非修飾c r R N A および修飾t r R N A を含む。一部の実施形態では、d g R N A のc r R N A およびt r R N A の両方は修飾を含む。

30

【0164】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるg R N A は、2つの別々のR N A 分子（デュアルガイドまたはd g R N A ）となる。表2、表3、および図21Cを参照のこと。

【0165】

一部の実施形態では、本発明は、a) 配列番号1~187のc r R N A 配列のうちのいずれか1つ；およびb) 配列番号188~227に記載されるt r R N A 配列のうちのいずれか1つを含むまたはそれからなるd g R N A を含む。

【0166】

一部の実施形態では、1~187の修飾c r R N A 配列のうちのいずれか1つを含むd g R N A が提供される。

40

【0167】

一部の実施形態では、188~227の修飾t r R N A 配列のうちのいずれか1つを含むd g R N A が提供される。

【0168】

一部の実施形態では、配列番号19~31、53~73、および104~130の修飾c r R N A 配列のうちのいずれか1つを含むd g R N A が提供される。一部の実施形態では、本発明は、配列番号19~31、53~73、および104~130の修飾配列のうちのいずれか1つを含むd g R N A を含み、c r R N A は、標的配列に少なくとも部分的に相補的であり、かつ切断のためにC a s 9をその標的に方向付ける5' スペース配列をさらに含む。

50

【0169】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号1～187に記載される配列のうちのいずれか1つを含むc r R N Aを含む。一部の実施形態では、本発明は、配列番号19～31、53～73、および104～130に記載される配列のうちのいずれか1つを含むまたはそれからなるc r R N Aを含む。一部の実施形態では、本発明は、配列番号19～31、53～73、および104～130に記載される配列のうちのいずれか1つおよびスパーサー領域を含むc r R N Aを含む。

【0170】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号：188～277に記載される配列のうちのいずれか1つを含むまたはそれからなるt r R N Aを含む。

10

【0171】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号1～187のうちのいずれか1つのヌクレオチドに対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有するヌクレオチドを含むc r R N Aを含み、修飾パターンは参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である。すなわち、ヌクレオチドA、U、C、およびGは、配列に示されるものと比較して99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%異なっているとしてもよいが、修飾は変更しないままである。

【0172】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号188～277のうちのいずれか1つのヌクレオチドに対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有するヌクレオチドを含むt r R N Aを含み、修飾パターンは参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である。すなわち、ヌクレオチドA、U、C、およびGは、配列に示されるものと比較して99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%異なっているとしてもよいが、各ヌクレオチド上の修飾は変更しないままである。

20

【0173】

3. 修飾を有するc r R N A、t r R N A、およびd g R N A

一部の実施形態では、c r R N Aは、5' 終端、下部ステム、バルジ、上部ステム、および3' 終端のうちの1つまたは複数内に1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む。

30

【0174】

一部の実施形態では、修飾は2'-O-Meを含む。

【0175】

一部の実施形態では、修飾は2'-Fを含む。

【0176】

一部の実施形態では、修飾は、1つまたは複数のヌクレオチドを連結するホスホロチオエート(P S)結合を含む。一部の実施形態では、修飾は、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのP S結合である。

【0177】

一部の実施形態では、修飾は逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。

40

【0178】

一部の実施形態では、上部ステム中の各ヌクレオチドにおいて2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含むc r R N Aが提供される。一部の実施形態では、c r R N AのU S - 1からU S - 14はそれぞれ2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、c r R N AのL S 1およびL S 6は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、c r R N AのL S 5は2'-O-Meで修飾されている。

【0179】

一部の実施形態では、上部ステム中のヌクレオチドのそれぞれ、ならびに下部ステム中のL S 1およびL S 6において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含むc r R N Aが提供さ

50

れる。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2'-O-Meまたは2'-O-m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0180】

一部の実施形態では、上部ステム中のヌクレオチドのそれぞれ、下部ステム中のLS1、LS5、およびLS6において2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む*c r R N A*が提供される。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2'-O-Meまたは2'-O-m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0181】

一部の実施形態では、本発明は、下部ステム中のLS1、LS2、およびLS6において2'-F修飾ヌクレオチドを含む*c r R N A*を含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、バルジ領域中のB1およびB2のそれぞれにおいて2'-F修飾ヌクレオチドをさらに含む。一部の実施形態では、本発明は、下部ステム中のLS1、LS2、およびLS6において、ならびにバルジ領域中のB1およびB2のそれぞれにおいて2'-F修飾ヌクレオチドを含む*c r R N A*を含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2'-O-Meまたは2'-O-m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0182】

一部の実施形態では、*c r R N A*は、下部ステム領域中のヌクレオチドLS1およびLS6；バルジ領域中の核酸のそれぞれ；および上部ステム領域中の核酸のそれぞれにおいて2'-O-Me修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*のLS5ヌクレオチドも2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、*c r R N A*のLS2、LS3、およびLS4は修飾されていない。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2'-O-Meまたは2'-O-m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0183】

一部の実施形態では、*c r R N A*は、下部ステム領域中のLS1、LS2、およびLS6、ならびにバルジ領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、下部ステム領域中のLS1、LS2、およびLS6、ならびにB2およびバルジ領域中のB2において2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、下部ステム領域中のLS1~LS6、およびバルジ領域中のヌクレオチドのそれぞれにおいて2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2'-O-Meまたは2'-O-m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0184】

一部の実施形態では、本発明は、以下の領域：5' 終端、上部ステム領域；バルジ領域；下部ステム領域；ネクサス領域；ヘアピン1領域；ヘアピン1領域とヘアピン2領域との間の介在領域；ヘアピン2領域；および3' 終端領域のうちの1つまたは複数内に1つまたは複数の修飾ヌクレオチドを含む*t r R N A*を含む。

【0185】

一部の実施形態では、修飾は2'-O-Meを含む。

【0186】

一部の実施形態では、修飾は2'-Fを含む。

【0187】

一部の実施形態では、修飾は、1つまたは複数のヌクレオチドを連結するホスホロチオエート(PS)結合を含む。一部の実施形態では、修飾は、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合である。

10

20

30

40

50

【0188】

一部の実施形態では、修飾は逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。

【0189】

一部の実施形態では、*t r R N A*は、上部ステム中の各核酸；バルジ領域中のB 1およびB 2；下部ステム領域中のLS 1およびLS 2；ネクサス領域中のN 3、N 4、N 5、N 15、N 16、N 17、およびN 18；ヘアピン1領域中の各ヌクレオチド；ヘアピン1領域とヘアピン2領域との間の1個のヌクレオチド；およびヘアピン2領域中の各ヌクレオチドにおいて2' - O - Me修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*t r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2' - O - Meまたは2' - O - m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。 10

【0190】

一部の実施形態では、*t r R N A*は、上部ステム中の各核酸；バルジ領域中の各ヌクレオチド；下部ステム領域中のLS 1、LS 2、LS 5、およびLS 6；ネクサス領域中のN 3 ~ N 5、N 10 ~ N 18；ヘアピン1領域中の各ヌクレオチド；ヘアピン1領域とヘアピン2領域との間の1個のヌクレオチド；およびヘアピン2領域中の各ヌクレオチドにおいて2' - O - Me修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*c r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2' - O - Meまたは2' - O - m o e修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0191】

一部の実施形態では、*t r R N A*は、ネクサス領域中のN 15からN 18において2' - F修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*t r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2' - F修飾ヌクレオチドをさらに含む。 20

【0192】

一部の実施形態では、*t r R N A*は、下部ステム領域中のLS 4およびLS 5、ならびにネクサス領域中のN 13 ~ N 18において2' - F修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、*t r R N A*は、5' および/または3' 終端領域中、例えば、5' および/または3' 末端修飾中に、1つまたは複数の2' - F修飾ヌクレオチドをさらに含む。

【0193】

一部の実施形態では、*t r R N A*は、下部ステム中のLS 1、LS 3、およびLS 5における2' - F修飾ヌクレオチドと、下部ステム中のLS 2、LS 4、およびLS 6における2' - O - Me修飾ヌクレオチドと、を含む。 30

【0194】

一部の実施形態では、以下の領域：5' 終端における最初の5個のヌクレオチド；下部ステム領域；バルジ領域；上部ステム領域；および3' 終端における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つまたは複数内に1つまたは複数の修飾を含む*c r i s p r R N A* (*c r R N A*) が本明細書に開示される。一部の実施形態では、修飾は2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含む。一部の実施形態では、5' 終端における最初の3個のヌクレオチド、および3' 終端における最後の3個のヌクレオチドが修飾されている。一部の実施形態では、5' 終端における最初の4個のヌクレオチド、および3' 終端における最後の4個のヌクレオチドはホスホロチオエート (PS) 結合により連結されている。一部の実施形態では、修飾は2' - O - Meを含む。一部の実施形態では、修飾は2' - Fを含む。一部の実施形態では、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドおよび3' 終端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5' 終端における最初の3個のヌクレオチドおよび3' 終端における最後の3個のヌクレオチドは2' - O - Me修飾を含む。一部の実施形態では、5' 終端における最初の4個のヌクレオチドおよび3' 終端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5' 終端における最初の3個のヌクレオチドおよび3' 終端における最後の3個のヌクレオチドは2' - F 40 50

修飾を含む。一部の実施形態では、LS1およびLS6は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれは2'-O-Meで修飾されている。

【0195】

一部の実施形態では、本発明は、以下のヌクレオチド：下部ステム領域中のLS1およびLS6；および上部ステム領域中の各ヌクレオチドにおいて2'-O-Me修飾核酸を含むcrisprRNA(crRNA)を含む。一部の実施形態では、crRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、crRNAは、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸と、3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸と、をさらに含む。一部の実施形態では、LS1、LS2、およびLS6は2'-Fで修飾されている。一部の実施形態では、バルジ領域中の各ヌクレオチドは2'-Fで修飾されている。

【0196】

一部の実施形態では、以下のヌクレオチド：下部ステム領域中のLS1、LS2、およびLS6と、バルジ領域中の各ヌクレオチドと、において2'-F修飾核酸を含むcrisprRNA(crRNA)が本明細書に開示される。一部の実施形態では、crRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、crRNAは、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおいて2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸、および3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおいて2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸をさらに含む。

【0197】

一部の実施形態では、配列番号1~187のうちのいずれか1つの核酸を含むcrRNAが提供される。一部の実施形態では、配列番号19~31、53~73、104~130、および161~187のうちのいずれか1つの核酸を含むcrRNAが提供される。一部の実施形態では、配列番号19~31、53~73、104~130、および161~187のうちのいずれか1つの核酸に対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、crRNAが提供される。一部の実施形態では、crRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

【0198】

以下の領域：5'末端における最初の5個のヌクレオチド；上部ステム領域；バルジ領域；下部ステム領域；ネクサス領域；ヘアピン1領域；ヘアピン2領域；および3'末端における最後の5個のヌクレオチドのうちの1つまたは複数内に1つまたは複数の修飾を含むtracrRNA(trRNA)も包含される。一部の実施形態では、修飾は2'-O-メチル(2'-O-Me)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-フルオロ(2'-F)修飾ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾はヌクレオチド間のホスホロチオエート(PS)結合を含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチド、および3'末端における最後の4個のヌクレオチドはホスホロチオエート(PS)結合により連結されている。一部の実施形態では、5'末端における最初の3個のヌクレオチド、および3'末端における最後の3個のヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、修飾は2'-O-Meを含む。一部の実施形態では、修飾は2'-Fを含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5'末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の3個のヌクレオチドは2'-O-Me修飾を含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の4個のヌクレオチドおよ

び3'末端における最後の4個のヌクレオチドはPS結合により連結されており、かつ5'末端における最初の3個のヌクレオチドおよび3'末端における最後の3個のヌクレオチドは2'-F修飾を含む。一部の実施形態では、上部ステム領域中の各ヌクレオチドは2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、バルジ領域内のB1およびB2は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、ネクサス領域中のN3、N4、N5、N15、N16、N17、およびN18は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、ヘアピン1領域中の各ヌクレオチドは2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、ヘアピン2領域中の各ヌクレオチドは2'-O-Meで修飾されている。

【0199】

一部の実施形態では、本発明は、以下のヌクレオチド：上部ステム中の各ヌクレオチド；バルジ領域内のB1およびB2；ネクサス領域中のN3、N4、N5、N15、N16、N17、およびN18；ヘアピン1領域中の各ヌクレオチド；およびヘアピン2領域中の各ヌクレオチドにおいて2'-O-Me修飾核酸を含むtracrRNA(tracrRNA)を含む。一部の実施形態では、tracrRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、tracrRNAは、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾ヌクレオチドと、3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸と、をさらに含む。一部の実施形態では、N15、N16、N17、およびN18は2'-Fで修飾されている。一部の実施形態では、LS1、LS3、およびLS5は2'-Fで修飾されており、かつLS2、LS4、およびLS6は2'-O-Meで修飾されている。一部の実施形態では、tracrRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。一部の実施形態では、tracrRNAは、5'末端における最初の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸と、3'末端における最後の3個のヌクレオチドにおける2'-O-Meまたは2'-F修飾核酸と、をさらに含む。

【0200】

一部の実施形態では、配列番号188~227のうちのいずれか1つの核酸を含むtracrRNAが提供される。一部の実施形態では、配列番号188~227のうちのいずれか1つの核酸に対して少なくとも99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または70%の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、tracrRNAが提供される。一部の実施形態では、tracrRNAは、5'末端における最初の4個のヌクレオチドを連結する3つのホスホロチオエート(PS)結合および3'末端における最後の4個のヌクレオチドを連結する3つのPS結合をさらに含む。

【0201】

一部の事例では、crRNAおよびtracrRNAを含むデュアルガイドが提供され、crRNAは配列番号1~187のうちのいずれか1つの核酸を含み、かつ、tracrRNAは配列番号188~227のうちのいずれか1つの核酸を含む。

【0202】

本明細書に開示されるcrRNAおよび本明細書に開示されるtracrRNAを含むデュアルガイドが包含され、本明細書に開示されるcrRNAおよび非修飾tracrRNAを含むデュアルガイドも包含される。一部の実施形態では、非修飾crRNAおよび本明細書に開示される修飾tracrRNAを含むデュアルガイドが提供される。

【0203】

一部の実施形態では、以下が包含される：
実施形態55。

crisprRNA(crRNA)であって、以下の領域：

a. 5'末端における最初の5個のヌクレオチドと、

10

20

30

40

50

b . 下部ステム領域と、
 c . バルジ領域と、
 d . 上部ステム領域と、
 e . 3' 終端における最後の 5 個のヌクレオチドと、のうちの 1 つまたは複数内に 1 つまたは複数の修飾を含む、c r RNA。

実施形態 56 .

修飾が 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 55 の c r RNA。

実施形態 57 .

修飾が 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 55 の c r RNA。 10

実施形態 58 .

修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (P S) 結合を含む、実施形態 55 の c r RNA。

実施形態 59 .

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが修飾されている、実施形態 55 ~ 58 のいずれか 1 つの c r RNA。

実施形態 60 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (P S) 結合により連結されている、実施形態 55 ~ 58 のいずれか 1 つの c r RNA。 20

実施形態 61 .

修飾が 2' - O - Me を含む、実施形態 59 の c r RNA。

実施形態 62 .

修飾が 2' - F を含む、実施形態 59 の c r RNA。

実施形態 63 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 ヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個の個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、実施形態 55 ~ 62 のいずれか 1 つの c r RNA。

実施形態 64 . 30

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - F 修飾を含む、実施形態 55 ~ 62 のいずれか 1 つの c r RNA。

実施形態 65 .

L S 1 および L S 6 が 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 55 ~ 60 のいずれか 1 つの c r RNA。

実施形態 66 .

上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 55 ~ 60 および 65 のいずれか 1 つの c r RNA。 40

実施形態 67 .

c r i s p r RNA (c r RNA) であって、

a . 下部ステム領域中の L S 1 および L S 6 と、
 b . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、c r RNA。

実施形態 68 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 67 の c r RNA。

実施形態 69 . 50

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態 67 または 68 の crRNA。

実施形態 70 .

LS1、LS2、および LS6 が 2' - F で修飾されている、実施形態 55 ~ 60 のいずれかの crRNA。

実施形態 71 .

バルジ領域中の各ヌクレオチドが 2' - F で修飾されている、実施形態 55 ~ 60 および 70 のいずれかの crRNA。

実施形態 72 .

crispr RNA (crRNA) であって、

a . 下部ステム領域中の LS1、LS2、および LS6 と、

b . バルジ領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - F 修飾ヌクレオチドを含む、crRNA。

実施形態 73 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、実施形態 70 ~ 72 のいずれか 1 つの crRNA。

実施形態 74 .

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドと、をさらに含む、実施形態 72 または 73 の crRNA。

実施形態 75 .

配列番号 1 ~ 187 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む crRNA。

実施形態 76 .

配列番号 19 ~ 31、53 ~ 73、104 ~ 130、および 161 ~ 187 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む crRNA。

実施形態 77 .

配列番号 19 ~ 31、53 ~ 73、104 ~ 130、および 161 ~ 187 のうちのいずれか 1 つの核酸に対して少なくとも 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70 % の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、crRNA。

実施形態 78 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、実施形態 75 ~ 77 のいずれか 1 つの crRNA。

実施形態 79 .

tracrRNA (trRNA) であって、

以下の領域：

a . 5' 終端における最初の 5 個のヌクレオチドと、

b . 上部ステム領域と、

c . バルジ領域と、

d . 下部ステム領域と、

e . ネクサス領域と、

f . ヘアピン 1 領域と、

g . ヘアピン 2 領域と、

h . 3' 終端における最後の 5 個のヌクレオチドと、のうちの 1 つまたは複数内に 1 つまたは複数の修飾を含む、trRNA。

実施形態 80 .

修飾が 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 79 の t

10

20

30

40

50

rRNA。

実施形態 81。

修飾が 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、実施形態 79 の tRNA。

実施形態 82。

修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含む、実施形態 79 の tRNA。

実施形態 83。

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (PS) 結合により連結されている、実施形態 79 ~ 82 のいずれか 1 つの tRNA。

10

実施形態 84。

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが修飾されている、実施形態 79 ~ 82 のいずれか 1 つの tRNA。

実施形態 85。

修飾が 2' - O - Me を含む、実施形態 84 の tRNA。

実施形態 86。

修飾が 2' - F を含む、実施形態 84 の tRNA。

実施形態 87。

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、実施形態 79 ~ 86 のいずれか 1 つの tRNA。

20

実施形態 88。

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されており、かつ 5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - F 修飾を含む、実施形態 79 ~ 86 のいずれか 1 つの tRNA。

実施形態 89。

上部ステム領域中の各ヌクレオチドが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 79 ~ 84 のいずれか 1 つの tRNA。

30

実施形態 90。

バルジ領域内の B1 および B2 が 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 79 ~ 84 および 89 のいずれか 1 つの tRNA。

実施形態 91。

ネクサス領域中の N3、N4、N5、N15、N16、N17、および N18 が 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 79 ~ 84 および 89 ~ 90 のいずれか 1 つの tRNA。

実施形態 92。

ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 79 ~ 84 および 89 ~ 91 のいずれか 1 つの tRNA。

40

実施形態 93。

ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドが 2' - O - Me で修飾されている、実施形態 79 ~ 84 および 89 ~ 92 のいずれか 1 つの tRNA。

実施形態 94。

tcrRNA (tRNA) であって、

a. 上部ステム中の各ヌクレオチドと、

b. バルジ領域内の B1 および B2 と、

c. ネクサス領域中の N3、N4、N5、N15、N16、N17、および N18 と、

d. ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、

e. ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを

50

含む、*t r R N A*。

実施形態 9 5 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 9 4 の *t r R N A*。

実施形態 9 6 .

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - M e または 2' - F 修飾ヌクレオチドと、3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - M e または 2' - F 修飾核酸と、をさらに含む、実施形態 9 4 または 9 5 の *c r R N A*。

実施形態 9 7 .

N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が 2' - F で修飾されている、実施形態 7 9 ~ 8 4 のいずれかの *t r R N A*。

実施形態 9 8 .

L S 1、L S 3、および L S 5 が 2' - F で修飾されており、かつ、L S 2、L S 4、および L S 6 が 2' - O - M e で修飾されている、

実施形態 7 9 ~ 8 4 および 9 7 のいずれかの *t r R N A*。

実施形態 9 9 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 8 7 ~ 9 8 のいずれか 1 つの *t r R N A*。

実施形態 1 0 0 .

5' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - M e または 2' - F 修飾ヌクレオチド、および 3' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - M e または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、実施形態 9 8 または 9 9 の *t r R N A*。

実施形態 1 0 1 .

配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む、*t r R N A*。

実施形態 1 0 2 .

配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つの核酸に対して少なくとも 9 9、9 8、9 7、9 6、9 5、9 4、9 3、9 2、9 1、9 0、8 5、8 0、7 5、または 7 0 % の同一性を有する核酸を含み、修飾パターンが参照配列識別子に示される修飾パターンと同一である、*t r R N A*。

実施形態 1 0 3 .

5' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、実施形態 1 0 1 ~ 1 0 2 のいずれか 1 つの *t r R N A*。

実施形態 1 0 4 .

c r R N A および *t r R N A* を含むデュアルガイドであって、*c r R N A* が配列番号 1 ~ 1 8 7 のうちのいずれか 1 つのヌクレオチドを含み、かつ、*t r R N A* が配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む、デュアルガイド。

実施形態 1 0 5 .

実施形態 5 5 ~ 7 8 のうちのいずれか 1 つの *c r R N A* および実施形態 7 9 ~ 1 0 3 のうちのいずれか 1 つの *t r R N A* を含む、デュアルガイド。

実施形態 1 0 6 .

実施形態 5 5 ~ 7 8 のうちのいずれか 1 つの *c r R N A* および非修飾 *t r R N A* を含む、デュアルガイド。

実施形態 1 0 7 .

非修飾 *c r R N A* および実施形態 7 9 ~ 1 0 3 のうちのいずれか 1 つの *t r R N A* を含む、デュアルガイド。

【 0 2 0 4 】

C . 終端部ヌクレオチドの修飾

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に記載されるガイドRNAのいずれかの5'または3'末端のヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、例えば、sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAの両方などの、ガイドRNAの3'末端領域中の末端部（すなわち、最後）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、ガイドRNAの3'末端領域中の末端部（すなわち、最後）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドは1つより多くの修飾を含む。一部の実施形態では、3'末端領域における末端部（すなわち、最後）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも1つは修飾されている。一部の実施形態では、3'末端領域中の末端部（すなわち、最後）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つは修飾されている。一部の実施形態では、3'末端領域中の末端部（すなわち、最後）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも3つは修飾されている。一部の実施形態で、修飾はPS連結を含む。

10

【0205】

一部の実施形態では、5'末端領域の5'末端は修飾されており、例えば、sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAの両方の最初の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドは修飾されている。一部の実施形態では、ガイドRNAの3'末端領域中の最初の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドは1つより多くの修飾を含む。一部の実施形態では、5'末端における末端部（すなわち、最初）の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも1つは修飾されている。一部の実施形態では、5'末端における末端部の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも2つは修飾されている。一部の実施形態では、5'末端における末端部の1個、2個、3個、4個、5個、6個、または7個のヌクレオチドのうちの少なくとも3つは修飾されている。一部の実施形態で、修飾はPS連結を含む。

20

【0206】

一部の実施形態では、ガイドRNA、例えば、sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAの両方の5'末端および3'末端（例えば、末端）の両方は修飾されている。一部の実施形態では、ガイドRNA、例えば、sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAの両方の5'末端のみが修飾されている。一部の実施形態では、ガイドRNA、例えば、sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA、またはcrRNAおよびtrRNAの両方の3'末端のみが修飾されている。

30

【0207】

一部の実施形態では、gRNAは、gRNAの5'末端における最初の7つのヌクレオチドのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、gRNAは、3'末端における末端部の7つのヌクレオチドのうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または7つにおいて修飾を含む。一部の実施形態では、5'末端における最初の4つのヌクレオチドのうちの2つ、3つ、もしくは4つおよび/または3'末端における末端部の4つのヌクレオチドのうちの2つ、3つ、もしくは4つは修飾されている。一部の実施形態では、5'末端における最初の4つのヌクレオチドのうちの2つ、3つ、または4つは、ホスホロチオエート（PS）結合により連結されている。

40

【0208】

一部の実施形態では、5'末端および/または3'末端の修飾は、ヌクレオチドへの2'-O-メチル（2'-O-Me）または2'-O-（2-メトキシエチル）（2'-O-moe）修飾を含む。一部の実施形態では、修飾は、ヌクレオチドへの2'-フルオロ（2'-F）修飾を含む。一部の実施形態では、修飾は、ヌクレオチド間のホスホロチオエート（PS）連結を含む。一部の実施形態では、修飾は逆位脱塩基ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、修飾は、2'-O-Me、2'-O-moe、2'-フルオロ（2'-F）、ヌク 50

レオチド間のホスホロチオエート (P S) 連結、および逆位脱塩基ヌクレオチドから選択される 1 つより多くの修飾を含む。一部の実施形態では、同等の修飾が包含される。

【 0 2 0 9 】

一部の実施形態では、ガイド RNA、例えば、s g RNA、d g RNA、c r RNA、t r RNA、または c r RNA および t r RNA の両方は、5' 終端における最初の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、または 7 個のヌクレオチドの間に 1 つまたは複数のホスホロチオエート (P S) 連結を含む。一部の実施形態では、ガイド RNA、例えば、s g RNA、d g RNA、c r RNA、t r RNA、または c r RNA および t r RNA の両方は、3' 終端における最後の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、または 7 個のヌクレオチドの間に 1 つまたは複数の P S 連結を含む。一部の実施形態では、ガイド RNA、例えば、s g RNA、d g RNA、c r RNA、t r RNA、または c r RNA および t r RNA の両方は、5' 終端および 3' 終端の両方において最後の 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、または 7 個のヌクレオチドの間に 1 つまたは複数の P S 連結を含む。一部の実施形態では、P S 連結に加えて、5' および 3' 終端ヌクレオチドは、2' - O - Me、2' - O - moe、または 2' - F 修飾ヌクレオチドを含んでもよい。

【 0 2 1 0 】

一部の実施形態では、ガイド RNA、例えば、s g RNA、d g RNA、c r RNA、t r RNA、または c r RNA および t r RNA の両方は、5' および 3' 終端における修飾ヌクレオチド、ならびに表 1 ~ 3 および図 2 1 A または図 2 1 C に記載される 1 つまたは複数の他の領域中の修飾ヌクレオチドを含む。

【 0 2 1 1 】

一部の実施形態では、c r RNA、t r RNA、または c r RNA および t r RNA の両方は、5' または 3' 末端においてではない修飾ヌクレオチドを含む。修飾の特定のパターンを以下および表 4 に記載する。

【 0 2 1 2 】

3 . g RNA および C a s タンパク質の送達

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの g RNA に加えて、本明細書で提供される組成物はヌクレアーゼをさらに含む。一部の実施形態では、ヌクレアーゼは C a s タンパク質である。一部の実施形態では、C a s タンパク質と一緒にした g RNA は C a s R N P と呼ばれる。一部の実施形態では、C a s タンパク質は、I I 型 C R I S P R / C a s システムからのものである。一部の実施形態では、C a s タンパク質は C a s 9 である。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は野生型 C a s 9 である。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (Streptococcus pyogenes) の C a s 9 タンパク質、例えば、S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 に由来する。一部の実施形態では、C a s 9 タンパク質は S . ピオゲネス (S. Pyogenes) に由来しないが、S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 と同じように機能し、S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 に特異的な g RNA は非 S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 をその標的部位に方向付ける。一部の実施形態では、C a s は標的 DNA 中の二本鎖切断を誘導する。S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 タンパク質の同等物は本明細書に記載される実施形態に包含される。

【 0 2 1 3 】

C a s 9 は、その改変物および変異型を包含する。不活性な、R u v C または H N H のいずれかの 1 つの触媒ドメインを有する C a s 9 の改変バージョンは「ニッカーゼ」と称される。ニッカーゼは標的 DNA 上の 1 鎖のみを切断し、したがって一本鎖切断を作り出す。一本鎖切断は「ニック」としても知られている場合もある。一部の実施形態では、組成物および方法はニッカーゼを含む。一部の実施形態では、組成物および方法は、標的 DNA 中に二本鎖切断ではなくニックを誘導するニッカーゼ C a s 9 を含む。

【 0 2 1 4 】

一部の実施形態では、C a s タンパク質は、1 つの機能的なヌクレアーゼドメインのみを含有するように改変されてもよい。例えば、C a s タンパク質は、ヌクレアーゼドメイ

ンのうちの1つを変異させまたは完全もしくは部分的に欠失させてその核酸切断活性を低減させるように改変されてもよい。一部の実施形態では、低減した活性を有するRuvCドメインを有するニッカーゼCasが使用される。一部の実施形態では、不活性RuvCドメインを有するニッカーゼCasが使用される。一部の実施形態では、低減した活性を有するHNHドメインを有するニッカーゼCasが使用される。一部の実施形態では、不活性HNHドメインを有するニッカーゼCasが使用される。

【0215】

一部の実施形態では、Casタンパク質のヌクレアーゼドメイン内の保存されたアミノ酸は、ヌクレアーゼ活性を低減または変化させるために置換される。一部の実施形態では、Casタンパク質は、RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン中にアミノ酸置換を含んでもよい。RuvCまたはRuvC様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、D10A(S.ピオゲネス(S. Pyogenes)のCas9タンパク質に基づく)が挙げられる。一部の実施形態では、Casタンパク質は、HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン中にアミノ酸置換を含んでもよい。HNHまたはHNH様ヌクレアーゼドメイン中の例示的なアミノ酸置換としては、E762A、H840A、N863A、H983A、およびD986A(S.ピオゲネス(S. Pyogenes)のCas9タンパク質に基づく)が挙げられる。

【0216】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるRNP複合体は、ニッカーゼ、および標的配列のセンス鎖およびアンチセンス鎖にそれぞれ相補的な一对のガイドRNAを含む。この実施形態では、ガイドRNAは、ニッカーゼを標的配列に方向付け、標的配列の反対鎖上にニックを生成すること(すなわち、二重ニック形成)により二本鎖切断(DSB)を導入する。一部の実施形態では、二重ニック形成の使用は、特異性を改善し、かつオフターゲット効果を低減させ得る。一部の実施形態では、ニッカーゼCasは、DNAの反対鎖を標的化する2つの別々のガイドRNAと共に使用されて、標的DNA中に二重ニックを生成する。一部の実施形態では、ニッカーゼCasは、近接するように選択された2つの別々のガイドRNAと共に使用されて、標的DNA中に二重ニックを生成する。

【0217】

一部の実施形態では、タンパク質の1つのドメインまたは領域が異なるタンパク質の部分により置換されたキメラCasタンパク質が使用される。一部の実施形態では、Casヌクレアーゼドメインは、異なるヌクレアーゼ、例えば、FokIからのドメインにより置換されてもよい。一部の実施形態では、Casタンパク質は改変されたヌクレアーゼであってもよい。

【0218】

一部の実施形態では、Casタンパク質は、異種機能性ドメインに連結した触媒不活性なCas9を含む融合タンパク質を含む(例えば、国際特許公開公報第2014152432号を参照のこと)。一部の実施形態では、触媒不活性なCas9はS.ピオゲネス(S. Pyogenes)からのものである。一部の実施形態では、触媒不活性なCas9は、Cas9を不活化する変異を含む。一部の実施形態では、異種機能性ドメインは、遺伝子発現、ヒストン、またはDNAを修飾するドメインである。一部の実施形態では、異種機能性ドメインは転写活性化ドメインまたは転写リプレッサードメインである。

【0219】

A. PAM

一部の実施形態では、標的配列はPAMに隣接してもよい。一部の実施形態では、PAMは、標的配列の3'末端の1個、2個、3個、または4個のヌクレオチドに隣接するまたはそれらのヌクレオチドの中にあってもよい。PAMの長さおよび配列は、使用されるCasタンパク質に依存する場合がある。例えば、PAMは、Ran et al., Nature 520: 186-191 (2015)(参照により本明細書に組み込まれる)の図1に開示されるものを含む、特定のCas9タンパク質またはCas9オルソログのコンセンサス配列または特定のPAM配列から選択されてもよい。一部の実施形態では、PAMは、2個、3個、4個、5

10

20

30

40

50

個、6個、7個、8個、9個、または10個のヌクレオチドの長さを含んでもよい。非限定的な例示的なPAM配列としては、NGG、NAG、NGA、NGAG、NGCG、NNGRRT、TTN、NGGNG、NG、NAAAAAN、NNAAAAW、NNNNACA、GNNNCNNA、およびNNNNGATT（式中、Nは任意のヌクレオチドとして定義され、WはAまたはTのいずれかとして定義され、RはAまたはGのいずれかとして定義される）が挙げられる。一部の実施形態では、PAM配列はNGGであってもよい。一部の実施形態では、PAM配列はNGGNGであってもよい。一部の実施形態では、PAM配列はNNAAAAWであってもよい。

【0220】

B．修飾gRNAの送達

10

脂質ナノ粒子（LNP）はヌクレオチドおよびタンパク質カーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるgRNA、mRNA、Cas9、およびRNPの送達のために使用されてもよい。一部の実施形態では、LNPは、核酸、タンパク質、またはタンパク質と共に核酸を送達する。

【0221】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるgRNAのいずれか1つを対象に送達する方法であって、gRNAがLNPと会合している、方法を含む。一部の実施形態では、gRNA/LNPは、Cas9またはCas9をコードするmRNAとも会合している。

【0222】

20

一部の実施形態では、本発明は、開示されるgRNAのいずれか1つおよびLNPを含む組成物を含む。一部の実施形態では、組成物は、Cas9またはCas9をコードするmRNAをさらに含む。

【0223】

一部の実施形態では、LNPはカチオン性脂質を含む。一部の実施形態では、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-ジエノエートを含む。一部の実施形態では、LNPは、約4.5のRNAリン酸に対するカチオン性脂質アミンのモル比(N:P)を含む。

30

【0224】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるgRNAと会合しているLNPは、疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するものである。

【0225】

エレクトロポレーションはカーゴの送達のための周知の手段であり、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つの送達のために任意のエレクトロポレーションの方法論を使用してもよい。一部の実施形態では、エレクトロポレーションは、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つおよびCas9またはCas9をコードするmRNAを送達するために使用されてもよい。

40

【0226】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つをex vivoの細胞に送達する方法であって、gRNAがLNPと会合している、またはLNPと会合していない、方法を含む。一部の実施形態では、gRNA/LNPまたはgRNAは、Cas9またはCas9をコードするmRNAとも会合している。

【0227】

4．遺伝子モジュレーションの方法

一部の実施形態では、本発明は、薬学的に許容される担体と共に本明細書に開示されるgRNAのうちのいずれか1つを含む医薬製剤を含む。一部の実施形態では、本発明は、

50

薬学的に許容される担体と共に本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つおよび LNP を含む医薬製剤を含む。一部の実施形態では、本発明は、薬学的に許容される担体と共に本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つ、Cas9 タンパク質または Cas9 タンパク質をコードする mRNA、および LNP を含む医薬製剤を含む。一部の実施形態では、医薬製剤は、疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される gRNA または医薬製剤のうちのいずれか 1 つを投与することを含む、ヒト患者を治療する方法を含む。

【0228】

一部の実施形態では、本発明は、Cas タンパク質または Cas mRNA および本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つまたは複数を投与または送達することを、標的 DNA を改変する方法または使用を含む。

10

【0229】

一部の実施形態では、本発明は、Cas タンパク質または Cas mRNA および本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つまたは複数を投与または送達することを、標的遺伝子のモジュレーションのための方法または使用を含む。一部の実施形態では、モジュレーションは標的遺伝子の編集である。一部の実施形態では、モジュレーションは、標的遺伝子によりコードされるタンパク質の発現の変化である。

【0230】

一部の実施形態では、方法または使用は遺伝子編集を結果としてもたらす。一部の実施形態では、方法または使用は標的遺伝子内の二本鎖切断を結果としてもたらす。一部の実施形態では、方法または使用は、DSB の非相同末端結合の間のインデル変異の形成を結果としてもたらす。一部の実施形態では、方法または使用は、標的遺伝子中のヌクレオチドの挿入または欠失を結果としてもたらす。一部の実施形態では、標的遺伝子中のヌクレオチドの挿入または欠失は、非機能的タンパク質を結果としてもたらすフレームシフト変異または未熟な終止コドンに繋がる。一部の実施形態では、標的遺伝子中のヌクレオチドの挿入または欠失は標的遺伝子発現のノックダウンまたは除去に繋がる。一部の実施形態では、方法または使用は DSB の相同組換え修復を含む。一部の実施形態では、方法または使用は、細胞に鋳型を送達することをさらに含み、鋳型の少なくとも一部分は、Cas タンパク質により誘導される二本鎖切断部位においてまたはその近くにおいて標的 DNA の中へと組み込まれる。

20

30

【0231】

一部の実施形態では、方法または使用は遺伝子モジュレーションを結果としてもたらす。一部の実施形態では、遺伝子モジュレーションは、遺伝子発現の増加もしくは減少、DNA のメチル化状態の変化、またはヒストンサブユニットの修飾である。一部の実施形態では、方法または使用は、標的遺伝子によりコードされるタンパク質の発現の増加または減少を結果としてもたらす。

【0232】

一部の実施形態では、本明細書に開示される gRNA のうちのいずれかは、疾患または障害を治療するための薬剤の調製において有用である場合がある。

40

【0233】

A. 遺伝子モジュレーションの測定

修飾 gRNA の有効性を *in vitro* および *in vivo* で試験することができる。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される gRNA の 1 つまたは複数を含み、gRNA は、Cas9 と共に細胞に提供された時に遺伝子モジュレーションを結果としてもたらす。一部の実施形態では、gRNA の有効性は、*in vitro* または *in vivo* アッセイにおいて測定することができる。

【0234】

1. Cas の有効性の *in vitro* 測定

一部の実施形態では、修飾 sgRNA を含む Cas RNP の活性は、非修飾 sgRNA

50

を含む Cas RNP の活性と比較される。

【0235】

一部の実施形態では、修飾 t r RNA を含む d g RNA を含む Cas RNP の活性は、非修飾 t r RNA を含む d g RNA を含む Cas RNP の活性と比較される。

【0236】

一部の実施形態では、修飾 c r RNA を含む d g RNA を含む Cas RNP の活性は、非修飾 c r RNA を含む d g RNA を含む Cas RNP の活性と比較される。

【0237】

一部の実施形態では、修飾 c r RNA および修飾 t r RNA を含む d g RNA を含む Cas RNP の活性は、非修飾 c r RNA および非修飾 t r RNA を含む Cas RNP の活性と比較される。

10

【0238】

一部の実施形態では、標的タンパク質の発現の増加または減少における g RNA の有効性は、標的タンパク質の量を測定することにより決定される。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される g RNA のうちのいずれか 1 つを含み、g RNA は、標的化された遺伝子から生成されるタンパク質の量を増加または減少させる。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される g RNA のうちのいずれか 1 つを対象に投与することを含む、タンパク質発現をモジュレートする方法を含み、g RNA は、標的タンパク質をコードする遺伝子へと Cas 9 を方向付け、かつ、標的タンパク質の発現は、Cas 9 をその遺伝子に標的化しない g RNA 対照と比較して増加または減少する。

20

【0239】

一部の実施形態では、特定の g RNA を用いた編集の有効性は、Cas 9 および g RNA (s g RNA または c r RNA および t r RNA を含む d g RNA のいずれか) の送達後のゲノム中の標的位置において存在する編集により決定される。一部の実施形態では、特定の g RNA を用いた編集の有効性は次世代シーケンシングにより測定される。一部の実施形態では、対象の標的領域の編集パーセンテージが決定される。一部の実施形態では、配列リードの総数に対する対象の標的領域へのヌクレオチドの挿入または欠失を有する配列リードの総数が g RNA および Cas 9 の送達後に測定される。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される修飾 g RNA のうちのいずれか 1 つを細胞に投与または送達することを含む、遺伝子編集の有効性を増加させる方法を含み、遺伝子編集のパーセンテージは、同様に修飾されていない対照 g RNA と比較して増加する。

30

【0240】

一部の実施形態では、特定の g RNA を用いた編集の効率は、遺伝子編集の成功により導入されたヌクレオチドの挿入または欠失の存在により測定される。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される修飾 g RNA のいずれか 1 つを細胞に投与または送達することを含む、遺伝子中のヌクレオチドの挿入または欠失を作り出す方法を含み、ヌクレオチドは、同様に修飾されていない対照 g RNA と比較して挿入または欠失される。一部の実施形態では、Cas 9 および g RNA の活性は、生化学的アッセイにおいて試験される。一部の実施形態では、Cas 9 および g RNA の活性は、無細胞切断アッセイにおいて試験される。一部の実施形態では、Cas 9 および g RNA の活性は、Neuro 2 A 細胞において試験される。

40

【0241】

一部の実施形態では、Cas 9 および s g RNA または修飾 c r RNA および / または t r RNA を含む d g RNA は、非修飾 s g RNA または非修飾 c r RNA および t r RNA を含む d g RNA と比較して類似の、より大きい、または低減した活性を示す。一部の実施形態では、Cas 9 ならびに修飾 s g RNA または修飾 c r RNA および / もしくは t r RNA を含む d g RNA は、非修飾 s g RNA または非修飾 c r RNA および t r RNA を含む d g RNA と比較して増進した活性を示す。

【0242】

2. Cas の有効性の in vivo 測定

50

一部の実施形態では、修飾 gRNA の活性は、修飾 gRNA および Cas タンパク質または Cas タンパク質をコードする mRNA を含む LNP の *in vivo* 投与後に測定される。

【0243】

一部の実施形態では、本明細書で提供される gRNA または組成物の *in vivo* の有効性は、gRNA および Cas の投与後の組織（例えば、肝臓組織）から抽出された DNA において測定された編集の有効性により決定される。

【0244】

3. 免疫系活性化の *in vivo* 測定

本明細書に開示される gRNA の修飾は、gRNA の *in vivo* 投与に対する対象の免疫応答を低減させる場合がある。一部の実施形態では、対象の免疫応答の活性化は、（例えば、LNP 中に配合された）Cas mRNA またはタンパク質と共に sgRNA または trRNA および crRNA を含む dgRNA の *in vivo* 投与後のサイトカイン（複数可）の血清濃度により測定される。一部の実施形態では、サイトカインは、インターフェロン - アルファ（IFN - アルファ）、インターロイキン 6（IL - 6）、単球走化性タンパク質 1（MCP - 1）、および / または腫瘍壊死因子アルファ（TNF - アルファ）である。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される gRNA のいずれか 1 つを投与することを含む、gRNA の送達に対する対象の免疫応答を低減させる方法を含み、gRNA は、投与後に対象の免疫系による低減された応答を生成する。一部の実施形態では、本発明は、同様に修飾されていない対照 gRNA と比較して投与後に対象の免疫系の活性化を低減させる方法を含む。

【0245】

一部の実施形態では、修飾 gRNA（例えば、sgRNA または dgRNA）と共に Cas RNP または Cas mRNA の投与は、非修飾 sgRNA の投与と比較して免疫サイトカインのより低い血清濃度（複数可）を生成する。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される gRNA のうちのいずれか 1 つを投与することを含む、免疫サイトカインの対象の血清濃度を低減させる方法を含み、gRNA は、同様に修飾されていない対照 gRNA と比較して対象の血清中の免疫サイトカインのより低い濃度を生成する。

【0246】

本記述および例示的な実施形態は、限定するものと解してはならない。本明細書および添付の特許請求の範囲の目的のために、別に指し示さない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される量、パーセンテージ、または割合、および他の数値を表す全ての数は、全ての場合に、既にそうではないと修飾されていない限り、「約」という用語により修飾されているものと理解されるべきである。したがって、そうでないことを指し示さない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載される数値的パラメータは、得ようとする所望の特性に応じて変化し得るおおよそのものである。少なくとも、そして請求項の範囲に対する均等論の適用を制限する試みではなく、各数値的パラメータは少なくとも、報告される有効数字の桁数に照らして、および通常の端数処理技法を適用することにより解釈されるべきである。

【0247】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a（1つの）」、「an（1つの）」および「the（その）」ならびに任意の単語のあらゆる単数形での使用は、明示的かつ明確に 1 つの指示対象に限定されない限り、複数の指示対象を含むことが留意される。本明細書で使用される場合、「含む」という用語およびその文法的変形は非限定的であることを意図し、リスト中の事項の記載は、リストした事項への代替または追加とすることができる他の同様の事項を除外しない。

【実施例】

【0248】

以下の実施例は、ある特定の開示された実施形態を説明するために提供するものであり、いかなる意味でも本開示の範囲を限定するものと解してはならない。

【0249】

実施例1 - 材料および方法

A. 合成ガイドRNA (gRNA)

デュアル (dgRNA、すなわち、crRNAおよびtrRNA) およびシングルガイド (sgRNA) の両方のフォーマットで、販売業者により表4に提供される修飾ヌクレオチドおよび連結を用いてgRNAを化学合成した。

【0250】

B. Cas9 mRNAのin vitro転写 (「IVT」)

線状化プラスミドDNA鋳型およびT7 RNAポリメラーゼを使用するin vitro転写によりN1 - メチルシュードUを含有するキャップ化およびポリアデニル化Cas9 mRNAを生成した。T7プロモーターおよび100ヌクレオチド (nt) ポリ (A/T) 領域を含有するプラスミドDNAをXbaIにより線状化し、それを商業的な製造者から得た。Cas9の修飾mRNAを生成するためのIVT反応物を37℃で4時間、以下の条件: 50 ng/μLの線状化プラスミド; 各2 mMのGTP、ATP、CTP、およびN1 - メチルシュードUTP (Trilink); 10 mMのARCA (Trilink); 5 U/μLのT7 RNAポリメラーゼ (NEB); 1 U/μLのマウスリボヌクレアーゼ阻害剤 (NEB); 0.004 U/μLの無機E. coliピロホスファターゼ (NEB); および1×反応緩衝液、でインキュベートした。4時間のインキュベーション後、TURBO DNase (ThermoFisher) を0.01 U/μLの最終濃度となるように加え、反応物をさらに30分間インキュベートしてDNA鋳型を除去した。MegaClear Transcription Clean-up kit (ThermoFisher) などのシリカ結合カラムまたはLiClの後にNaOAcを含むEtOHを使用する沈殿ステップを含む標準的なプロトコールを使用して酵素およびヌクレオチドからCas9 mRNAを精製した。260 nmでの吸光度を測定 (Nanodrop) することにより転写物濃度を決定し、Bioanalyzer (Agilent) によるキャピラリー電気泳動により転写物を分析した。

【0251】

C. Neuro2A細胞におけるCas9 mRNAおよびgRNAのトランスフェクション

10%のウシ胎児血清を補充したDMEM培地中でマウス細胞株Neuro2Aを培養し、トランスフェクションの24時間前に96ウェルプレート中に15,000細胞/ウェルの密度でプレートした。トランスフェクションの日に、培地を細胞から吸引し、新鮮な培地で置き換えた。Lipofectamine - 2000 (Invitrogen) をOpti-MEM (Invitrogen) 中で1:50 (v/v) に希釈した。Cas9 mRNAおよびシングルガイドRNAをOpti-MEM中に別々に希釈した。デュアルガイドフォーマットについては、crRNAおよびtrRNAと一緒にOpti-MEM中に1:1のモル比で希釈した。Cas9 mRNAおよびgRNAの両方を別々に、希釈したLipofectamine - 2000と1:1 (v/v) で混合し、2つのリボプレックスを生成させた。5分間のインキュベーション後、100 ngのCas9 mRNA/ウェルおよび0.4 μLの総リボプレックス試薬の最終濃度となるようにリボプレックスを細胞に連続的に加えた。各実験について、25 nMおよび2.5 nM、16.7 nMおよび1.67 nM、10 nMおよび1 nM、8.3 nMおよび0.83 nM、および3 nMおよび0.3 nMを含む2つの用量レベルでガイドを試験した。デュアルガイドについては、この濃度は、等モル量のcrRNAおよびtrRNA、例えば、25 nMの総デュアルガイドを生成する25 nMのcrRNAおよび25 nMのtrRNAを含む。トランスフェクションの24時間後に細胞を溶解させ、溶解液を直接的にPCR反応に使用してNGSにより編集について解析した。

【0252】

1×NLSを有するCas9 mRNA (配列番号359):

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGC

CUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAAUUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUC
CGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGU
CCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUU
GACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACA
CCCGGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCGAACGAAAUGGCAAA
GGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAG
AAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAA
AGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCCGA
CCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCUCGCCCAUAUGAUCAAUUCGCGGACACUUCUG
AUCGAAGGCGAUCUGAACCUGAUAAUCUCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUG
GUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUGCUAGCGGCGUCGAUG
CCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCGUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGC
ACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUUCUCACUG
GGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAAC
UCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCACAAUUGGCGAUC
GUACGCGGAUCUGUUCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAUUCUUGCUGUCCGA
UAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAG
CGGUACGACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCGUCUCAAGCGCUCGUGAGACAGCAAC
UGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCGAGGGUA
CAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAA
AGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCGGGA
AACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUCGCCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCA
CGCCAUCUUGCGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAG
AUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGGCCACUGGGCGCGCGGCA
AUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUU
UCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAA
CUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAA
UACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAUAGAGG
AAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUAAGA
CCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUAAGAAGAUUCGAGUG
UUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCGUGGGAACC
UAUCAUGAUCUCCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAACGAGGAGAACG
AGGACAUCCUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGA
UCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACU
CAAGCGCCGCGGUACACUGGUUGGGGCGCCUCUCCGCAAGCUGAUAACGGUAUU
CGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUA
AUCGUAAAUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCA
AAAAGCACAAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCC
GGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUG
GUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAA
ACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGA
AGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAG
CUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAAUUGCAAAUUGGACGGGACAUGUACGUG
GACCAAGAGCUGGACAUAUUCGGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCAC
AGUCCUUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGA
ACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUU
ACUGGCGGCAGCUCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCAC
UAAAGCCGAGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUAUCAAACGGCAG
CUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGGACUCCCGCAUGA
ACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAA

10

20

30

40

50

AAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAU
CAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUG
AUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUAC
GACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAU
ACUUCUUUUACUCAAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUUACGCUGGCCAAUG
GAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUG
GGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAU
AUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAAAGGAAUCGAUCCUCCCAA
AGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG
AGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAG
GGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAAC
GAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGG
UGAAGAAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGG
UCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUG
CCUAGCAAGUACGUCAACUUCUUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGU
CACCGGAAGAUAAACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUUUCUGGA
UGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAAC
CUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGG
CCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAA
GUACUUCGAUACUACUAUCGAUCGAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGAC
GCGACCCUGAUCCACCAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGC
AGCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGAAGAGAAAGGUGUAAUGAGCUA
GCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGA
UCAAUAGCUUAUUCAUUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCU
AAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAUUUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAUUUAAUAA
AAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAA
AAAAA
AAAAUCUAG

【 0 2 5 3 】

2 x N L S および H A タグを有する C a s 9 m R N A (配列番号 3 6 0) :

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGC
CUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAAUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUC
CGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGU
CCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUU
GACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUACA
CCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUUUUUCGAACGAAAUGGCAAA
GGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAG
AAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCACGAAA
AGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUACUACGACAAGGCCGA
CCUCAGAUUGAUUCUACUUGGCCUCGCCCAUUGAUCAAUUCGCGGACACUUCUG
AUCGAAGGCGAUCUGAACCUGAUAAUCUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUAACUG
GUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAUAGCGGCGUCGAUG
CCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGCGUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGC
ACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCUCACUG
GGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCGGAGGACGCGAAGCUGCAAC
UCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUUGCUGGCACAAUUGGCGAUC
GUACGCGGAUCUGUUCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAUUCUUGCUGUCCGA
UAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAG
CGGUACGACGAGCAUACACGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCUCGUGAGACAGCAAC
UGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGGUA

CAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAA
AAGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCGGGA
AACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUCUCCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCA
CGCCAUCUUGCGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAG
AUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGGCCACUGGGCGCGCGGCA
AUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUU
UCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAA
CUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGCACAGCCUCCUUUACGAA
UACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUGAAAUAACGUUACUGAAGGAUAGAGG
AAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUGCUGUUAAGA
CCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUAAGAAGAUCGAGUG
UUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUGGGGAACC
UAUCAUGAUCUCCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAACGAGGAGAACG
AGGACAUCCUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGA
UCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACU
CAAGCGCCGCGGUACACUGGUUGGGGCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUAACGGUAUU
CGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAAUCGGAUGGCUUCGCUA
AUCGUAAACUUAUGCAAUUGAUCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCA
AAAAGCACAAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCC
GGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUG
GUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUGAAAUGGCCCGAGAAA
ACCAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGA
AGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAG
CUGCAGAACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGUACGUG
GACCAAGAGCUGGACAUAUUCGGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCAC
AGUCCUUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGA
ACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGUGCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUU
ACUGGCGGCAGCUCUGAUAUGCGAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCAC
UAAAGCCGAGCGCGGCGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUAUCAAAACGGCAG
CUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUUUGGACUCCCGCAUGA
ACACUAAAUAACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAA
AAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAU
CAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCCUG
AUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUAC
GACGUGAGGAAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUUCGGGAAAGCAACUGCGAAAU
ACUUCUUUUACUCAAAACAUCAUGAACUUUUUCAAGACUGAAAUUACGCUGGCCAAUG
GAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUUCGUGUG
GGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAU
AUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUCAAAGGAUUCGAUCCUCCAA
AGAGAAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGG
AGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAG
GGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAAC
GAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUCCUGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGG
UGAAGAAGGAUCUGAUAUCAAAACUCCCAAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGG
UCGGAAGCGCAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUG
CCUAGCAAGUACGUCAACUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAGGGU
CACCGGAAGAUAAACGAACAGAAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUUUCUGGA
UGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAAC
CUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGG
CCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUCAA

10

20

30

40

50

GUACUUCGAUACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGAC
 GCGACCCUGAUCCACCAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGC
 AGCUGGGUGGCGAUUGGCUCGGCUUACCCAUACGACGUGCCUGACUACGCCUCGCUCGG
 AUCGGGCUCCCCCAAAAAGAAACGGAAGGUGGACGGAUCCCCGAAAAAGAAGAGAAAG
 GUGGACUCCGGAUGAGAAUUAUGCAGUCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCC
 UACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUCUUUUUCU
 UUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUAUAUCAUU
 UUGCCUCUUUUUCUGUGCUUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUCUAG

10

【0254】

D．初代肝細胞

初代マウス肝細胞 (PMH) (Gibco) を製造者のプロトコール (Invitrogen、プロトコール 11.28.2012) にしたがって培養した。簡潔に述べれば、細胞を解凍し、添加物を含む肝細胞解凍培地 (Gibco、商品番号 CM7000) 中に再懸濁した後、100g で 10 分間遠心分離した。上清を廃棄し、ペレット化した細胞を添加物バックを加えた肝細胞プレティング培地 (Invitrogen、商品番号 A1217601 および CM3000) 中に再懸濁した。細胞を計数し、Bio-coat コラーゲン I をコーティングした 96 ウェルプレート (ThermoFisher、商品番号 877272) に 15,000 細胞/ウェルの密度でプレートし、37 °C および 5 % の CO₂ 雰囲気中で 5 時間インキュベートして単層を形成させた。5 時間後、プレティング培地を除去し、Cas9 mRNA およびガイド RNA に加えて 3 % のマウス血清を配合した LNP 含有する補充した肝細胞培養培地 (Invitrogen、商品番号 A1217601 および CM4000) で置き換えた。LNP は、ウェル当たり 100 ng の Cas9 mRNA および約 30 nM のガイド RNA の開始用量レベルから希釈し、ウェル当たり 0.1 ng の mRNA および 0.03 nM のガイド RNA まで連続希釈を実行した。細胞を 37 °C および 5 % の CO₂ 雰囲気中で約 48 時間インキュベートした後、本明細書に記載される細胞溶解および NGS 解析を行った。

20

【0255】

E．脂質ナノ粒子 (「LNP」) の配合

30

約 4.5 の RNA リン酸に対するカチオン性脂質アミンのモル比 (N:P) で LNP を配合した。以下のモル比で脂質ナノ粒子成分を 100 % のエタノール中に溶解させた：45 モル % (12.7 mM) のカチオン性脂質 (例えば、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)；44 モル % (12.4 mM) のヘルパー脂質 (例えば、コレステロール)；9 モル % (2.53 mM) の中性脂質 (例えば、DSPC)；および 2 モル % (0.563 mM) の PEG (例えば、PEG2k - DMG)。25 mM の酢酸ナトリウム緩衝液中、pH 4.5 で RNA カーゴを調製し、約 0.45 mg/mL の RNA カーゴの濃度とした。

40

【0256】

Precision Nanosystems NanoAssembler (商標) Benchtop Instrument を製造者のプロトコールにしたがって使用して脂質および RNA 溶液のマイクロ流体混合により LNP を形成させた。流速差を使用して混合の間、2:1 の水性溶媒対有機溶媒の比を維持した。

【0257】

LNP 配合手順 A：混合後、LNP を回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、約 1:1) 中に希釈した後、10 kDa Slide-a-Lyzer™ G2 Dialysis

50

s Cassette (ThermoFisher Scientific) を使用して緩やかに攪拌しながら 4 で終夜、残りの緩衝液を PBS (試料体積の 100 倍過剰) 中に交換した。10 kDa Amicon スピンフィルターを使用して LNP を濃縮 (4 、4000 g での遠心分離) して所望の濃度を達成した。次に、結果として得られた混合物を 0.2 μm の滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として得られた濾液を 2 ~ 8 で貯蔵した。

【0258】

LNP 配合手順 B : 混合後、LNP を回収し、pH 7.5 の 50 mM のトリス中に希釈した後 (約 1 : 1)、10 kDa Slide-a-Lyzer™ G2 Dialysis Cassette (ThermoFisher Scientific) を使用して緩やかに攪拌しながら 4 で終夜、LNP を pH 7.5 の 50 mM のトリス (試料体積の 100 倍過剰) 中に交換した。10 kDa Amicon スピンフィルターを使用して LNP を濃縮 (4 、4000 g での遠心分離) して所望の濃度の 2 倍を達成した。これらの濃縮された LNP を pH 7.5 にて 50 mM のトリス、90 mM の NaCl、10 % のスクロース (2X TSS) と 1 : 1 で混合した。次に、結果として得られた混合物を 0.2 μm の滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として得られた濾液を -80 で貯蔵した。

【0259】

LNP 配合手順 C : 25 mM のクエン酸ナトリウム、100 mM の塩化ナトリウム中、pH 5 で RNA カーゴを調製し、約 0.45 mg/mL の RNA カーゴの濃度とした。混合後、LNP を 3 : 1 の比で水中に回収した。LNP を室温で 1 時間インキュベートし、水と 1 : 1 で混合した。次にそれらを、製造者のプロトコールを使用して PD-10 カラム (GE Healthcare) 上で 1X TSS (50 mM のトリス、45 mM の NaCl、5 % のスクロース、pH 7.5) に緩衝液交換した。10 kDa Amicon スピンフィルターを使用して LNP を濃縮 (4 、4000 g での遠心分離) して所望の濃度を達成した。次に、結果として得られた混合物を 0.2 μm の滅菌フィルターを使用して濾過した。結果として得られた濾液を -80 で貯蔵した。

【0260】

F. 次世代シーケンシング (「NGS」) およびオンターゲット切断効率の解析

ゲノム中の標的位置での編集の効率を定量的に決定するために、ディープシーケンシングを利用して、遺伝子編集により導入された挿入および欠失の存在を同定した。

【0261】

標的部位 (例えば、TTR、FVII) 周辺の PCR プライマーを設計し、対象のゲノム区画を増幅した。プライマー配列を以下の表 5 に提供する。

【表 5】

表 5

ガイド	遺伝子	フォワードプライマー (5' - 3')	配列番号	リバープライマー (5' - 3')	配列番号
CR000686/G000209 標的化ドメインに基づくガイドを用いる実験用	TTR	AGTCAATAATCAGAATCAGCAGGT	333	AGAAGGCACTTCTCTTATCTAAGGT	337
CR000705/G000211 標的化ドメインに基づくガイドを用いる実験用	TTR	GTTTTGTCCAGAGTCTATCACCG	334	ACACGAATAAGAGCAAATGGGAAC	338
G000269/G000285 標的化ドメインに基づくガイドを用いる実験用	TTR	ATTACCAGCTTAGCATCCTGTGAA	335	ACACGGTTTATAGACGAAGAACAC	339
CR000657/G000208 標的化ドメインに基づくガイドを用いる実験用	FVII	AGCACATGAGACCTTCTGTTTCTC	336	GACATAGGTGTGACCTCACAATC	340

シーケンシングのために必要な化学物質を加えるために製造者のプロトコール (Illumina) にしたがって追加の PCR を行った。Illumina MiSeq in

s t r u m e n t でアンブリコンをシーケンシングした。低いクオリティスコアを有するものを除去した後、リードをヒト参照ゲノム（例えば、h g 3 8）に対してアライメントした。リードを含有する結果として得られたファイルを参照ゲノム（B A M ファイル）にマッピングし、対象の標的領域と重なり合ったリードを選択し、挿入、置換、または欠失を含有するリードの数に対する野生型リードの数を算出した。

【0262】

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

【0263】

G . i n v i v o での L N P 送達

6 ~ 10 週齢の範囲の C D - 1 雌マウスを各試験において使用した。動物を計量し、グループの平均重量に基づいて投与溶液を調製するために体重にしたがってグループ化した。動物当たり 0 . 2 m L の体積（体重 1 キログラム当たり約 10 m L）で側尾静脈を介して L N P を投与した。有害効果について投与の約 6 時間後に動物を観察した。投与の 24 時間後に体重を測定し、イソフルラン（isoflourane）麻酔下での心臓穿刺を介する失血により様々な時点において動物を安楽死させた。血液を血清セパレーターチューブ中または本明細書に記載される血漿用の緩衝化クエン酸ナトリウムを含有するチューブ中に採取した。i n v i v o での編集を伴う研究について、DNA 抽出および解析のために各動物の中葉から肝臓組織を採取した。

【0264】

H . サイトカイン誘導解析

この解析のために、尾静脈に切り込みを入れることによりおよそ 50 ~ 100 μ L の血液を血清サイトカイン測定のために採取した。血液を室温で約 2 時間凝血させ、次いで 1000 \times g で 10 分間遠心分離させた後、血清を採取した。I L - 6、T N F - アルファ、I F N - アルファ、および M C P - 1 を測定する L u m i n e x ベースの磁気ビーズマルチプレックスアッセイ（A f f y m e t r i x P r o c a r t a P l u s、商品番号 E x p 0 4 0 - 0 0 0 0 0 - 8 0 1）を採取した試料におけるサイトカイン分析のために使用した。キットの試薬および標準物質を製造者のプロトコールに指示される通りに調製した。25 μ L の希釈した抗体でコーティングした磁気ビーズを含有するウェルに 25 μ L のマウス血清を加えた。プレートを室温で 2 時間インキュベートした後、洗浄した。希釈したビオチン抗体（50 μ L）をビーズに加え、室温で 1 時間インキュベートした。ビーズを再び洗浄した後、50 μ L の希釈したストレプトアビジン - P E を各ウェルに加え、30 分間インキュベートした。ビーズをもう一度洗浄した後、100 μ L の洗浄緩衝液中に懸濁し、B i o - P l e x 200 i n s t r u m e n t（B i o - R a d）で読み取った。5 パラメーターロジスティック曲線フィットを使用して標準曲線から算出されたサイトカイン濃度を用いて B i o p l e x M a n a g e r v e r . 6 . 1 解析パッケージを使用してデータを解析した。

【0265】

I . ゲノム DNA の単離

i n v i v o での研究のために、ビーズベースの抽出キット M a g M A X - 96 D N A M u l t i - S a m p l e K i t（T h e r m o F i s h e r、商品番号 4413020）を、溶解緩衝液（10 m g の組織当たりおよそ 400 μ L）中で組織をホモジナイズすることを含む製造者のプロトコールにしたがって使用して、10 m g の組織からゲノム DNA を抽出した。本明細書に記載されるように、P C R およびその後の N G S 解析のために、全ての DNA 試料を 100 n g / μ L の濃度に正規化した。

【0266】

J . トランスサイレチン（T T R）の E L I S A 分析

血液を採取し、血清を指し示された通りに単離した。M o u s e P r e a l b u m i n（T r a n s t h y r e t i n）E L I S A K i t（A v i v a S y s t e m s B

10

20

30

40

50

i o l o g y、商品番号 O K I A 0 0 1 1 1) を使用して総 T T R 血清レベルを決定した。キットの試薬および標準物質を製造者のプロトコールにしたがって調製した。1 x のアッセイ希釈剤を用いてマウス血清を 1 0 , 0 0 0 倍の最終希釈まで希釈した。2 回の逐次的な 5 0 倍希釈を実行することによりこれを行い、2 5 0 0 倍の希釈を結果として得た。1 0 , 0 0 0 倍の総試料希釈のために最終の 4 倍希釈ステップを実行した。両方の標準曲線希釈液 (各 1 0 0 μ L) および希釈した血清試料を、捕捉用抗体を予めコーティングした E L I S A プレートの各ウェルに加えた。プレートを室温で 3 0 分間インキュベートした後、洗浄した。酵素 - 抗体コンジュゲート (ウェル当たり 1 0 0 μ L) を 2 0 分間のインキュベーションのために加えた。未結合の抗体コンジュゲートを除去し、プレートを再び洗浄した後、発色基質溶液を加えた。プレートを 1 0 分間インキュベートした後、1 0 0 μ L の停止溶液、例えば、硫酸 (およそ 0 . 3 M) を加えた。4 5 0 n m の吸光度において S p e c t r a M a x M 5 プレートリーダーでプレートを読み取った。4 パラメーターロジスティック曲線フィットを使用して S o f t M a x P r o ソフトウェア v e r . 6 . 4 . 2 により標準曲線から血清 T T R レベルを算出した。最終の血清値をアッセイ希釈について調整した。

10

【 0 2 6 7 】

実施例 2 - 修飾 g R N A の操作および i n v i t r o 試験

表 4 に示されるように、デュアルガイドフォーマット (d g R N A) で修飾 g R N A を設計した。その結果、修飾 c r R N A および t r R N A の両方を設計および化学合成して、d g R N A を形成する修飾および非修飾の構成成分を対形成させた。これらのペアリングを図に指し示す濃度で N e u r o 2 A 細胞へとトランスフェクトし、実施例 1 に記載されるように N G S により編集効率 (例えば、編集パーセント) を測定した。

20

【 0 2 6 8 】

マウス T T R 遺伝子を標的化する表 4 のある特定の修飾 c r R N A を C a s 9 m R N A および非修飾 t r R N A (T R 0 0 0 0 0 2) と共にトランスフェクトした。試験したガイドは配列番号 1 ~ 1 8 を含んだ。図 1 に示されるように、(非修飾 t r R N A と共に) 修飾 c r R N A の一部は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、他の修飾 c r R N A は活性を減少させた。

【 0 2 6 9 】

並行して、表 4 の修飾 t r R N A をマウス T T R 遺伝子の同じ配列を標的化する非修飾 c r R N A (C R 0 0 0 6 8 6) と一緒に C a s 9 m R N A と共にトランスフェクトした。試験したガイドは配列番号 1 8 8 ~ 2 0 0、および 2 0 4 を含んだ。図 2 に示されるように、(非修飾 c r R N A と共に) 修飾 t r R N A の多くは、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、修飾 t r R N A の一部は活性を減少させた。

30

【 0 2 7 0 】

化学修飾ヌクレオチドの置換に加えて、試験した c r R N A および t r R N A のペアリングの一部も配列置換により操作して、例えば、親配列においては見られない G - C 対形成を結果としてもたらした。試験したガイドは配列番号 1 5 および 2 0 1 ; 1 6 および 2 0 2 ; 1 および 1 8 8 を含んだ。図 3 に示されるように、1 つのそのようなペアリング (配列番号 1 6 および 2 0 2) は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を結果としてもたらしたが、ペアリングの 2 つは活性を減少させた。

40

【 0 2 7 1 】

次に、表 4 の修飾 c r R N A および修飾 t r R N A のペアリングを試験した。図 4 に示されるように、修飾 t r R N A と共に修飾 c r R N A のペアリングの一部は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、ペアリングの一部は活性を減少させた。図 4 では、列の見出しは実験で使用した異なる t r R N A を表し、行の見出しは使用した異なる c r R N A を表す。実験で使用した組合せを判定するためには、列を行にマッチさせる。T R 0 0 0 0 0 2 および C R 0 0 0 6 8 6 は非修飾対照である (右下の欄を参照のこと) 。

【 0 2 7 2 】

50

d g R N A の設計に基づいて、表 4 および図 1 5 D に描写されるように、修飾 c r R N A および t r R N A の一部の態様を特徴として、対応するシングルガイド R N A (s g R N A) を操作した。配列番号 2 2 8 ~ 2 3 4 のこれらの s g R N A も N e u r o 2 A 細胞において試験し、図 5 に示されるように、修飾 s g R N A のそれぞれは、5 ' および 3 ' 末端修飾のみを含有する対照 (G 0 0 0 0 2 0 9 ; 配列番号 2 2 8) と同等の活性を示した。

【 0 2 7 3 】

表 4 および図 6 に描写される追加の d g R N A ガイドについて類似のセットの実験を実行した。試験したガイドは配列番号 3 2 ~ 4 7 、 および 1 を含んだ。これもまたマウス T T R 遺伝子を標的化する修飾 c r R N A を C a s 9 m R N A および非修飾 t r R N A (T R 0 0 0 0 0 2) と共にトランスフェクトした。図 6 に示されるように、非修飾 t r R N A と共に) 修飾 c r R N A の一部は、非修飾対照 (C R 0 0 0 6 8 6) と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、他の修飾 c r R N A は活性を減少させた。

【 0 2 7 4 】

並行して、図 7 に示されるように、表 4 の修飾 t r R N A をマウス T T R 遺伝子の同じ配列を標的化する非修飾 c r R N A (C R 0 0 0 6 8 6) と一緒に C a s 9 m R N A と共にトランスフェクトした。試験したガイドは配列番号 2 0 5 ~ 2 2 2 、 および 1 を含んだ。図 7 に示されるように、(非修飾 c r R N A と共に) 修飾 t r R N A の多くは、非修飾対照 (T R 0 0 0 0 0 2) と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、修飾 t r R N A の一部は活性を減少させた。

【 0 2 7 5 】

化学修飾ヌクレオチドの置換に加えて、表 4 からの試験した c r R N A および t r R N A のペ어링の一部も配列置換により操作して、例えば、親配列においては見られない G - C 対形成または G - U ミスマッチ (「 G U ウォブル」) を結果としてもたらした。図 8 に示されるように、修飾およびペ어링の一部は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、一部 (例えば、 「 G U ウォブル」 またはミスマッチペ어링) は活性を減少させた。図 8 は、配列番号 4 8 ~ 5 2 、 および 1 に示される c r R N A ガイドと共に配列番号 2 2 3 ~ 2 2 7 および 1 8 8 に示される t r R N A ガイドを使用した結果を示す。

【 0 2 7 6 】

次に、表 4 からの修飾 c r R N A および修飾 t r R N A の選択したペ어링を図 9 に示されるように試験した。修飾 t r R N A と共に修飾 c r R N A のペ어링の一部は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、ペ어링の一部は活性を減少させた。図 9 では、列の見出しは実験において使用した異なる t r R N A を表し、行の見出しは使用した異なる c r R N A を表す。実験において使用した組合せを判定するためには、列を行にマッチさせる。非修飾対照は T R 0 0 0 0 0 2 、 および C R 0 0 0 6 8 6 である。

【 0 2 7 7 】

表 4 からの修飾 g R N A (d g R N A および s g R N A) の一部は純粋に生化学的なアッセイ (すなわち、無細胞切断アッセイ) においても試験した。興味深いことに、 N e u r o 2 A 細胞において概ね不活性であった修飾 g R N A の多くは生化学的アッセイにおいて活性であり、そのような生化学的アッセイは細胞中の修飾 g R N A の活性が予測されない可能性があることを指し示す (データ示さず) 。

【 0 2 7 8 】

実施例 3 . 他の標的に対する修飾 g R N A のさらなる試験

ある特定の修飾が g R N A の活性に影響することが確立されたので、 (1) 同じ遺伝子中の別々の配列を標的化した時、または (2) 異なる遺伝子中の配列を標的化した時にこれらの修飾が活性に影響することになるかどうかを次に試験した。その結果、マウス T T R 遺伝子中の別の配列だけでなくマウス第 V I I 因子 (F V I I) 遺伝子中の配列も標的化する g R N A を操作し、実施例 2 において試験したある特定の修飾パターンを有するように合成した (表 4 を参照のこと) 。これらの g R N A を図に指し示す濃度で N e u r o

10

20

30

40

50

2 A細胞へとトランスフェクトし、実施例 1 に記載されるように N G S により編集効率（例えば、編集パーセント）を測定した。

【 0 2 7 9 】

マウス T T R 遺伝子（実施例 2 において標的化したものとは異なる配列）またはマウス F V I I 遺伝子のいずれかを標的化する表 4 の修飾 c r R N A を C a s 9 m R N A および非修飾 t r R N A（T R 0 0 0 0 0 2）と共にトランスフェクトした。試験したガイドは図 1 2 A および図 1 2 B に示されるものを含んだ。（非修飾 t r R N A と共に）修飾 c r R N A の一部は、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、他の修飾 c r R N A は活性を減少させた。

【 0 2 8 0 】

並行して、表 4 からの修飾 t r R N A を、マウス T T R 遺伝子の同じ配列（C R 0 0 0 7 0 5；実施例 2 において標的化したものとは異なる配列）またはマウス F V I I 遺伝子（C R 0 0 0 6 5 7）の同じ配列を標的化する非修飾 c r R N A と一緒に C a s 9 m R N A と共にトランスフェクトした。図 1 3 A および図 1 3 B に示されるように、（非修飾 c r R N A と共に）修飾 t r R N A の多くは、非修飾対照と比較して類似のまたは増進した活性を付与したが、修飾 t r R N A の一部は活性を減少させた。このデータは、ある特定の修飾パターンは異なる配列にわたって類似の効果を有する傾向があったことを示す。

【 0 2 8 1 】

上記される d g R N A の設計に基づいて、修飾 c r R N A および t r R N A の一部の態様を特徴として、対応するシングルガイド R N A（s g R N A）を操作した。表 4 を参照のこと。これらの s g R N A も N e u r o 2 A 細胞において試験した。結果を図 1 0（マウス T T R）および図 1 1（マウス F V I I）に示す。一部の修飾パターンは、異なる遺伝子を標的化した時でさえ類似の効果を結果としてもたらすことをこれらの実験は示す。

【 0 2 8 2 】

実施例 4 . i n v i v o での修飾 g R N A の試験

i n v i t r o 試験の後、修飾が i n v i v o での編集のために何らかの利益を付与するかどうかを決定するために 6 つの別々の研究において修飾 s g R N A を動物に送達した。

【 0 2 8 3 】

実施例 1 に記載されるように、化学修飾 s g R N A（T T R または F V I I を標的化する）と共に I V T C a s 9 m R N A を含んで L N P を配合した。m R N A : s g R N A の比は、R N A 成分の質量基準でおよそ 1 : 1 であった。別に指し示さない限り、本実施例に記載される研究において使用した C a s 9 m R N A は配列番号 3 6 0 の配列を有し、上述の L N P 配合手順 A を使用して L N P を配合した。

【 0 2 8 4 】

1 つの実験では、2 m g / k g の単回投与の L N P をマウス（群当たり n = 5）に投与し、投与の 4 時間後に血清サイトカイン分析のために血液を採取した。投与の 7 日後の解剖において、肝臓および血液をそれぞれ編集効率の N G S 測定および血清 T T R の分析のために採取した。この実験における s g R N A のそれぞれは T T R 遺伝子中の同じ配列を標的化し、s g R N A 間の唯一の差異はそれぞれに対して行った修飾であった（図 1 4 A ~ D および 1 5 A ~ E；表 4、配列番号 2 2 8 ~ 2 3 4 を参照のこと）。G 0 0 0 2 0 9（2 ロットを試験した）は、修飾のより少ない対照として機能し、s g R N A の 5' 末端および 3' 末端の両方のそれぞれにおける 3 つの末端部ヌクレオチドにおいて、およびそれらの間で 2' - O - メチル修飾およびホスホロチオエート連結のみを有した（図 1 5 D を参照のこと）。

【 0 2 8 5 】

図 1 4 A ~ D に示す結果は、より重度に修飾した s g R N A は、修飾がより少ない G 0 0 0 2 0 9 対照と比較して、アッセイした各サイトカインについてより低い応答を誘導する傾向があったことを示す。より重度に修飾した s g R N A はまた、修飾がより少ない対照（G 0 0 0 2 0 9 ロット）についての約 4 4 ~ 4 7 % と比較して、より重度に修飾した

10

20

30

40

50

s g R N Aのうちの2つ(例えば、G 0 0 0 2 6 3およびG 0 0 0 2 6 7)について約60%に達する編集パーセントを有して、処置した動物の肝臓においてより高い編集効率を付与した(図15A)。重要なことに、血清のT T Rレベルのノックダウンは、修飾がより少ない対照と同等またはそれより有意に高かったため、編集効率は表現型の変化と相関した(例えば、図15A~15BにおいてG 0 0 0 2 0 9ロットに対してG 0 0 0 2 6 3およびG 0 0 0 2 6 7を参照のこと)。末端修飾G 0 0 0 2 0 9と高度修飾G 0 0 0 2 6 7との差異を図15Dおよび図15Eに要約する(2'-O-Me修飾ヌクレオチドを太字で示し、*はホスホロチオエート連結を表す)。

【0286】

別のin vivo研究において、マウスT T R遺伝子中の別々の配列を標的化する3つのs g R N Aを試験した。2mg/kg、1mg/kg、または0.3mg/kgの単回投与のL N Pをマウス(群当たりn=5)に投与した。投与の4時間後に血清サイトカイン分析のために血液を採取した。投与の7日後の解剖において、肝臓および血液をそれぞれ編集効率のN G S測定および血清T T Rの分析のために採取した。この研究において、s g R N Aのそれぞれは、1つのs g R N Aは完全に非修飾で(G 0 0 0 2 0 1(配列番号243))、別のs g R N Aは、s g R N Aの5'末端および3'末端の両方のそれぞれにおける3つの末端部ヌクレオチドにおいて、およびそれらの間に2'-O-メチル修飾およびホスホロチオエート連結を伴う末端修飾のみを有して(G 0 0 0 2 1 1(配列番号241))、3つ目のs g R N Aは、先行するin vivo研究におけるG 0 0 0 2 6 7と同じ修飾パターンを有して(G 0 0 0 2 8 2(配列番号242))、T T R遺伝子中の同じ配列(先行するin vivo研究において標的化したものとは異なる配列)を標的化した。

【0287】

図16A~16Dに示されるように、s g R N Aのそれぞれは、試験したサイトカインのそれぞれについて用量依存的な様式で類似の応答を結果としてもたらした。編集効率について、非修飾s g R N A(G 0 0 0 2 0 1(配列番号243))はin vivoでは編集をほとんど付与しなかったが、重度に修飾したs g R N A(G 0 0 0 2 8 2(配列番号242))は、2mg/kgの用量で約60%に達するレベルを付与し、これは修飾がより少ないs g R N A(G 0 0 0 2 1 1(配列番号241))で達成されたレベルより著しく高かった(図17AおよびB)。先行するin vivo研究と同様、編集のレベルは血清T T Rのノックダウンの量と相関した(図17CおよびD)。

【0288】

マウスT T R遺伝子中のさらに異なるT T R配列を標的化する(2つの先行するin vivo研究において標的化したものとは異なる配列を標的化する)別のセットの3つのs g R N Aを用いて、第2のin vivo研究と類似の研究を次に実行した。マウス(群当たりn=5)に2mg/kg、1mg/kg、または0.3mg/kgの単回投与のL N Pを投与した。投与の4時間後に血清サイトカイン分析のために血液を採取した。投与の7日後の解剖において、肝臓および血液をそれぞれ編集効率のN G S測定および血清T T Rの分析のために採取した。この研究において、s g R N Aのそれぞれは、1つのs g R N Aは完全に非修飾(G 0 0 0 2 8 5;(配列番号332))で、別のs g R N Aは、s g R N Aの5'末端および3'末端の両方のそれぞれにおける3つの末端部ヌクレオチドにおいて、およびそれらの間に2'-O-メチル修飾およびホスホロチオエート連結を伴う末端修飾のみを有して(G 0 0 0 2 6 9(配列番号330))、3つ目のs g R N Aは、先行する2つのin vivo研究におけるG 0 0 0 2 6 7およびG 0 0 0 2 8 2と同じ修飾パターンを有して(G 0 0 0 2 8 3(配列番号331))、T T R遺伝子中の同じ配列(先行する2つのin vivo研究において標的化したものとは異なる配列)を標的化した。

【0289】

本研究では、非修飾s g R N A(G 0 0 0 2 8 5(配列番号332))はin vivoでの編集をほとんど付与しなかったが、重度に修飾したs g R N A(G 0 0 0 2 8 3(

10

20

30

40

50

配列番号 331)) は、 2 mg/kg の用量で約 60% に達するレベルを付与し、これは修飾がより少ない sgRNA (G000269 (配列番号 330)) で達成されたレベルより著しく高かった (図 18A ~ 18B)。先行する *in vivo* 研究と同様、編集のレベルは血清 TTR のノックダウンの量と相関した (図 18C)。

【0290】

第 4 の *in vivo* 研究では、sgRNA に対する修飾の効果を別の遺伝子 (FVII) について評価した。研究内比較のために、第 1 の *in vivo* 研究において試験した sgRNA のうちの 2 つを含めた (G000209 および G000267)。マウス (群当たり $n = 5$) に 2 mg/kg 、 1 mg/kg 、または 0.3 mg/kg の単回投与の LNP を投与し、投与の 4 時間後に血清サイトカイン分析のために血液を採取した。投与の 6 日後の解剖において、肝臓を編集効率の NGS 測定のために採取した。この研究では、sgRNA のそれぞれは TTR または FVII 遺伝子中の同じ配列を標的化し、それぞれのために 1 つの sgRNA は、sgRNA の 5' 末端および 3' 末端の両方のそれぞれにおける 3 つの終端部ヌクレオチドにおいて、およびそれらの間に 2'-O-メチル修飾およびホスホロチオエート連結の両方を有する末端修飾のみを有し (FVII について G000208 (配列番号 286)、TTR について G000209)、2 つ目の sgRNA は、先行する *in vivo* 研究における G000267、G000282、および G000283 と同じ修飾パターンを有し (FVII について G000373 (配列番号 287) ; TTR について G000267 (配列番号 234))。

【0291】

図 19A ~ 19D に示されるように、sgRNA のそれぞれは、試験したサイトカインのそれぞれについて用量依存的な様式で類似の応答を結果としてもたらした。編集効率について、FVII を標的化するより重度に修飾された sgRNA (G000373 (配列番号 287)) は、試験した用量のそれぞれにわたって、修飾がより少ないバージョン (G000208 (配列番号 286)) と比較して編集効率の増加を有した (図 18A)。これらの結果は、TTR を標的化する sgRNA についても観察された (図 20A ~ 20B)。

【0292】

別の *in vivo* 研究において、G000282 と同じマウス TTR 遺伝子中の配列を標的化する 10 個の追加の sgRNA を試験した。比較目的のために G000282 も研究に含めた。マウス (群当たり $n = 5$) に 1 mg/kg または 0.5 mg/kg の単回投与の LNP を投与した。この研究において使用した LNP は、上述の LNP 配合手順 B を使用して配合した。投与の 7 日後の解剖において、肝臓および血液をそれぞれ編集効率の NGS 測定および血清 TTR の分析のために採取した。この研究において、sgRNA のそれぞれは TTR 遺伝子中の同じ配列を標的化した。試験した各 sgRNA の修飾パターンは様々であり、sgRNA の 5' 終端、3' 終端、ヘアピン 1、ヘアピン 2、ネクサス、下部ステム、バルジ、および上部ステム中に 2'-OMe、2'-F、および PS 修飾を含んだ。編集% (図 22A)、編集の平均および標準偏差 (図 22B)、ならびに血清 TTR レベル (図 22C) を含むこの研究の結果を図 22A ~ 22C に示す。本明細書に記載される方法にしたがって、これらの同じ sgRNA を初代マウス肝細胞において試験した。編集% (図 24A)、用量応答曲線 (図 24B)、および EC50 値 (図 24C) を含むこの用量応答 TTR 編集研究の結果を図 24A ~ 24C に示す。

【0293】

別の *in vivo* 研究では、マウス TTR 遺伝子中の G000282 と同じ配列を標的化する 13 個の追加の sgRNA を試験した。比較目的のために G000282 も研究に含めた。マウス (群当たり $n = 5$) に 1 mg/kg の単回投与の LNP を投与した。この研究において使用した LNP は、上述の LNP 配合手順 C を使用して配合した。この研究において使用した Cas9 mRNA は配列番号 359 の配列を有した。投与の 4 時間後に血清サイトカイン分析のために血液を採取した。投与の 7 日後の解剖において、肝臓および血液をそれぞれ編集効率の NGS 測定および血清 TTR の分析のために採取した。

この研究において、s g R N A のそれぞれは T T R 遺伝子中の同じ配列を標的化した。試験した s g R N A は、s g R N A の 5' 終端、3' 終端、ヘアピン 1、ヘアピン 2、および上部ステム中に追加の 2' - O M e および P S 修飾を含んだ。編集% (図 2 3 A)、編集の平均% (図 2 3 B)、および血清 T T R レベル (図 2 3 C) を含むこの研究の結果を図 2 3 A ~ 2 3 C に示す。

以下の態様を包含し得る。

[1] シングルガイド R N A (s g R N A) であって、5' 末端修飾と、

a . 上部ステム領域、

b . ヘアピン 1 領域、および

c . ヘアピン 2 領域のうちの 1 つまたは複数中の 1 つまたは複数の修飾と、を含み、

前記 5' 末端修飾が、5' 終端の 5' 末端における最初の 7 個のヌクレオチドの中に少なくとも 2 つのホスホロチオエート (P S) 連結を含む、s g R N A 。

[2] 少なくとも 1 つの修飾が 2' - O - メチル (2' - O - M e) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1] に記載の s g R N A 。

[3] 少なくとも 1 つの修飾が 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1] または上記 [2] に記載の s g R N A 。

[4] 少なくとも 1 つの修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (P S) 結合を含む、上記 [1] ~ [3] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[5] 前記上部ステム領域中に 1 つまたは複数の修飾を含む、上記 [1] ~ [4] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[6] U S 1 ~ U S 1 2 において修飾を含む、上記 [5] に記載の s g R N A 。

[7] 前記ヘアピン 1 領域中に 1 つまたは複数の修飾を含む、上記 [1] ~ [6] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[8] H 1 - 1 において修飾を含む、上記 [7] に記載の s g R N A 。

[9] 前記ヘアピン 2 領域中に 1 つまたは複数の修飾を含む、上記 [1] ~ [8] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 0] H 2 - 1 において修飾を含む、上記 [9] に記載の s g R N A 。

[1 1] H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 において修飾を含む、上記 [1] ~ [1 0] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 2] H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 において修飾を含む、上記 [1] ~ [1 1] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 3] 前記上部ステム領域、前記ヘアピン 1 領域、および前記ヘアピン 2 領域のそれぞれの中に 1 つまたは複数の修飾を含む、上記 [1] ~ [1 2] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 4] ヘアピン 1 領域とヘアピン 2 領域との間に修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1] ~ [1 3] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 5] 修飾を含む下部ステム領域をさらに含む、上記 [1] ~ [1 4] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 6] 修飾を含む 3' 終端領域をさらに含む、上記 [1] ~ [1 5] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[1 7] 前記 3' 終端中に 3' 末端修飾をさらに含む、上記 [1 6] に記載の s g R N A 。

[1 8] 前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドのうちの少なくとも 2 つが修飾されている、上記 [1 7] に記載の s g R N A 。

[1 9] 前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドのうちの少なくとも 2 つが 2' - O - M e 、2' - F、または 2' - O - m o e で修飾されている、上記 [1 7] に記載の s g R N A 。

[2 0] 前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドのうちの 1 つまたは複数の間にホスホロチオエート (P S) 結合をさらに含む、上記 [1 7] ~ [1 9] のいずれか 1 項に記載の s g R N A 。

[2 1] 修飾を含むバルジ領域をさらに含む、上記 [1] ~ [2 0] のいずれか 1 項に

記載の s g R N A。

[2 2] 修飾を含むネクサス領域をさらに含む、上記 [1] ~ [2 1] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[2 3] 少なくとも、前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチド、および前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが修飾されている、上記 [1] ~ [2 2] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[2 4] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチド、および前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (P S) 結合により連結されている、上記 [1] ~ [2 3] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[2 5] 前記末端修飾が 2 ' - O - M e を含む、上記 [2 4] に記載の s g R N A。

10

[2 6] 前記末端修飾が 2 ' - F を含む、上記 [2 4] に記載の s g R N A。

[2 7] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2 ' - O - M e 修飾を含む、上記 [1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[2 8] 前記 5 ' 終端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5 ' 終端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2 ' - O - M e、2 ' - F、および / または 2 ' - O - m o e 修飾を含む、上記 [1] ~ [2 6] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

20

[2 9] L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および / または L S 1 2 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [2 8] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 0] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドのそれぞれが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [2 9] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 1] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 5 0 % が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [2 9] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 2] 前記上部ステム領域中の前記ヌクレオチドのそれぞれが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [3 1] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 3] 前記ネクサス領域中の N 1 6、N 1 7、および / または N 1 8 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [3 2] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

30

[3 4] ネクサス領域中の N 1 5、N 1 6、N 1 7、および / または N 1 8 が修飾されている、上記 [1] ~ [3 2] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 5] 前記ネクサス領域中の前記修飾が 2 ' - O - M e および 2 ' F から選択される、上記 [3 3] または上記 [3 4] に記載の s g R N A。

[3 6] N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が P S 結合で連結されている、上記 [3 2] ~ [3 5] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 7] 前記ヘアピン 1 領域中の前記ヌクレオチドのそれぞれが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [3 6] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

[3 8] 前記ヘアピン 2 領域中の前記ヌクレオチドのそれぞれが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1] ~ [3 7] のいずれか 1 項に記載の s g R N A。

40

[3 9] シングルガイド R N A (s g R N A) であって、2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドを以下の位置：

a . 5 ' 終端の 5 ' 末端における最初の 3 ヌクレオチドと、

b . 下部ステム領域中の L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および / または L S 1 2 と、

c . バルジ領域中の B 1 および / または B 2 と；

d . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、

e . ネクサス領域中の N 1 6、N 1 7、および / または N 1 8 と、

f . ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、

50

- g. ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、
- h. 3' 終端における最後の 4 個のヌクレオチドと、において含む、s g RNA。
- [4 0] B 3 ~ B 6 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [3 9] に記載の s g RNA。
- [4 1] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、上記 [3 9] に記載の s g RNA。
- [4 2] L S 9 および L S 1 0 が、例えば、2' - F または 2' - OMe で修飾されている、先行する上記 [1] ~ [4 1] のいずれか 1 項に記載の s g RNA。
- [4 3] N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が、例えば、2' - F または 2' - OMe で修飾されている、上記 [1] ~ [4 2] のいずれか 1 項に記載の s g RNA。
- [4 4] H 2 - 9、H 2 - 1 0、H 2 - 1 1、H 2 - 1 2、H 2 - 1 3、H 2 - 1 4、および H 2 - 1 5 が 2' - F で修飾されている、上記 [1] ~ [4 3] のいずれか 1 項に記載の s g RNA。
- [4 5] 前記 3' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドが 2' - F で修飾されている、上記 [1] ~ [4 4] のいずれか 1 項に記載の s g RNA。
- [4 6] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、2' - F 修飾ヌクレオチドを以下の位置：
- a. 下部ステム領域中の L S 9 および L S 1 0 と、
- b. ネクスス領域中の N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 と、
- c. ヘアピン 2 領域中の H 2 - 9、H 2 - 1 0、H 2 - 1 1、H 2 - 1 2、H 2 - 1 3、H 2 - 1 4、および H 2 - 1 5 と、において含む、s g RNA。
- [4 7] 3' 終端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおいて 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [4 6] に記載の s g RNA。
- [4 8] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (P S) 結合および前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、上記 [4 6] または上記 [4 7] に記載の s g RNA。
- [4 9] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、かつ前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドの 3 つにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [4 6] ~ [4 8] のいずれか 1 項に記載の s g RNA。
- [5 0] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、
- a. 5' 終端の 5' 末端における最初の 3 ヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. U S 1 ~ U S 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- c. H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- d. H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- e. 3' 終端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g RNA。
- [5 1] L S 1 および / または L S 6 において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [5 0] に記載の s g RNA。
- [5 2] ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間に 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [5 0] または上記 [5 1] に記載の s g RNA。
- [5 3] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、
- a. 5' 終端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
- b. L S 1 ~ L S 6 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

c. US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 d. H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 e. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 f. H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、
 g. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

[54] シングルガイド RNA (sgRNA) であって、

a. 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

b. LS 2 ~ LS 5 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

10

c. LS 1 および LS 6 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d. US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

e. H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g. H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

[55] シングルガイド RNA (sgRNA) であって、

a. 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

20

b. US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

c. LS 7、LS 8、LS 11、および LS 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d. H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

e. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f. H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

[56] シングルガイド RNA (sgRNA) であって、

a. 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

30

b. US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

c. LS 7、LS 8、LS 11、および LS 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d. LS 9 および LS 10 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、

e. H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g. H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

40

[57] シングルガイド RNA (sgRNA) であって、

a. 5' 末端の 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

b. US 1 ~ US 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

c. LS 8、LS 10、および LS 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

d. LS 7、LS 9、および LS 11 における 2' - O - F 修飾ヌクレオチドと、

e. H 1 - 1 ~ H 1 - 12 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

f. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

g. H 2 - 1 ~ H 2 - 15 における 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

h. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌ

50

クレオチドと、を含む、s g RNA。

[5 8] シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

g . 3 ' 末端の 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g RNA。

[5 9] シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . L S 1、L S 6、L S 7、L S 8、L S 1 1、および L S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . L S 9 および L S 1 0 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

d . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

e . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

f . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

h . 3 ' 末端の 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g RNA。

[6 0] シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 5 ' 個の端の 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . H 1 - 1 ~ H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

e . H 2 - 1 ~ H 2 - 8 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 9 ~ H 2 - 1 5 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

g . 3 ' 末端における最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

h . 3 ' 末端の 3 ' 末端における最後のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、を含む、s g RNA。

[6 1] シングルガイドRNA (s g RNA) であって、

a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおける 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

b . U S 1 ~ U S 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

c . H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 1 0、および H 1 - 1 2 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

d . H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、および H 1 - 1 1 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

e . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間の 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

f . H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 1 0、H 2 - 1 2 ; および H 2 - 1 4 における 2 ' - F 修飾ヌクレオチドと、

g . H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 1 1 ; H 2 - 1 3、および H 2 - 1 5 における 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドと、

h . 3 ' 末端における最後から 2 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2 ' 50

- F 修飾ヌクレオチドと、

i. 3' 末端の 3' 末端における最後から 3 つ目、および最後のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

[6 2] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [5 0] ~ [6 1] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[6 3] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 7 個のヌクレオチド内に少なくとも 1 つのホスホロチオエート (PS) 結合をさらに含む、上記 [5 0] ~ [6 1] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[6 4] シングルガイド RNA (sgRNA) であって、

a. 2' - O - Me 修飾ヌクレオチド LS 8、LS 10、LS 12、H 1 - 2、H 1 - 4、H 1 - 6、H 1 - 8、H 1 - 10、H 1 - 12、H 2 - 1、H 2 - 3、H 2 - 5、H 2 - 7、H 2 - 9、H 2 - 11、H 2 - 13、および H 2 - 15 と、

b. LS 7、LS 9、LS 11; H 1 - 1、H 1 - 3、H 1 - 5、H 1 - 7、H 1 - 9、H 1 - 11、H 1 - 13、H 2 - 2、H 2 - 4、H 2 - 6、H 2 - 8、H 2 - 10、H 2 - 12、および H 2 - 14 における 2' - F 修飾ヌクレオチドと、を含む、sgRNA。

[6 5] 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [6 4] に記載の sgRNA。

[6 6] a. 3' 末端の 3' 末端における最後および最後から 3 つ目のヌクレオチドにおける 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドと、

b. 3' 末端の 3' 末端における最後から 2 つ目および最後から 4 つ目のヌクレオチドにおける 2' - F 修飾ヌクレオチドと、をさらに含む、上記 [6 4] または上記 [6 5] に記載の sgRNA。

[6 7] 表 4 の修飾を含む、配列番号 2 2 8 ~ 3 3 2 のうちのいずれかを含む、sgRNA。

[6 8] 表 4 の修飾を含む、配列番号 2 3 5 ~ 2 4 0、2 6 5 ~ 2 8 5、および 3 0 9 ~ 3 2 9 のうちのいずれかを含む、sgRNA。

[6 9] 配列番号 2 4 0 を含む、sgRNA。

[7 0] 表 4 の修飾を含む配列番号 2 4 0 を含む、sgRNA。

[7 1] 表 4 の修飾を含む配列番号 2 4 2 を含む、sgRNA。

[7 2] 表 4 に描写されるように、配列番号 2 4 2 の修飾を含む、sgRNA。

[7 3] 配列番号 3 5 8 を含む、sgRNA。

[7 4] 配列番号 2 3 5 ~ 2 4 0、2 6 5 ~ 2 8 5、および 3 0 9 ~ 3 2 9 のうちのいずれか 1 つの核酸に対して少なくとも 9 9、9 8、9 7、9 6、9 5、9 4、9 3、9 2、9 1、9 0、8 5、8 0、7 5、または 7 0 % の同一性を有する核酸を含み、表 4 における参照配列識別子のヌクレオチドに対応する sgRNA の各ヌクレオチドにおける修飾が、表 4 における参照配列識別子に示される修飾と同一または同等である、sgRNA。

[7 5] 前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホロチオエート (PS) 結合および前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [6 6] ~ [7 4] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[7 5] 前記ヘアピン 1 領域中の前記ヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1] ~ [7 4] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[7 6] 前記ヘアピン 2 領域中の前記ヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1] ~ [7 5] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[7 7] 前記上部ステム領域中の前記ヌクレオチドを連結する少なくとも 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1] ~ [7 6] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

[7 8] S. ピオゲネス (S. Pyogenes) の Cas 9 とリボ核タンパク質複合体を形成する、上記 [1] ~ [7 7] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。

10

20

30

40

50

[7 9] 上部ステム領域中の各ヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[8 0] 以下のヌクレオチド：U S 1、U S 2、U S 3、U S 4、U S 5、U S 6、U S 7、U S 8、U S 9、U S 10、U S 11、および U S 12 のうちの 1、2、3、または 4、5、6、7、8、9、10、または 11 個において 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[8 1] ヘアピン 1 領域およびヘアピン 2 領域中のヌクレオチドの 50% またはそれより多くにおいて 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[8 2] 上部ステム領域中の各ヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾を含み、かつヘアピン 1 領域およびヘアピン 2 領域中のヌクレオチドの 50% またはそれより多くにおいて 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

10

[8 3] H 2 - 1 または H 2 - 2 に始まり 3' 終端の最後のヌクレオチドまでの各ヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾を含むまたはそれからなる、ガイド RNA。

[8 4] L S 1 および / または L S 6 において 2' - O - Me 修飾を含みまたはそれからなり、かつ L S 2 ~ L S 5 において修飾を含まない、ガイド RNA。

[8 5] L S 8、L S 9、L S 10、L S 11、および / または L S 12 のうちの 2 つまたはそれより多くにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、ガイド RNA。

[8 6] 少なくとも L S 8 および L S 10 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [8 5] に記載のガイド RNA。

[8 7] ネクサス領域中の前記ヌクレオチドの 50% またはそれより多くにおいて 2' - O - Me 修飾をさらに含む、上記 [7 9] ~ [8 6] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

20

[8 8] 前記ネクサス領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [8 7] に記載のガイド RNA。

[8 9] ネクサス領域中のヌクレオチドの最大 50% において 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[9 0] ネクサス領域中の 4 つまたはそれより多くのヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[9 1] 前記ネクサス領域中のヌクレオチド N 2 ~ N 6 のうちの少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つが 2' - O - Me で修飾されている、上記 [9 0] に記載のガイド RNA。

30

[9 2] ネクサス領域中の 10 個またはそれより多くのヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、ガイド RNA。

[9 3] 少なくとも N 2 ~ N 6 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [9 2] に記載のガイド RNA。

[9 4] バルジ領域中のヌクレオチドの 50% またはそれより多くにおいて 2' - O - Me 修飾を含む、ガイド RNA。

[9 5] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [9 4] に記載のガイド RNA。

40

[9 6] B 2、B 3、および / または B 4 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [9 4] に記載のガイド RNA。

[9 7] バルジ領域中の 3 つまたはそれより多くのヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、ガイド RNA。

[9 8] B 2、B 3、および / または B 4 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [9 7] に記載のガイド RNA。

[9 9] 上記 [1] ~ [9 8] のいずれか 1 項に記載の前記ガイド RNA の前記修飾パターンを有する配列番号 357 の前記ヌクレオチドを含む、ガイド RNA。

[100] 上記 [1] ~ [9 9] のいずれか 1 項に記載の前記ガイド RNA の前記修飾

50

パターンを有する配列番号 356 の前記ヌクレオチドを含む、ガイド RNA。

[101] 前記 5' 終端領域の前記 5' 末端における最初の 3 個、4 個、または 5 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾をさらに含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[102] 前記 3' 終端領域の前記 3' 末端における最後の 3 個、最後の 4 個、または最後の 5 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me 修飾をさらに含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[103] 前記 3' 終端領域の前記 3' 末端における最後のヌクレオチドが修飾されていない、上記 [102] に記載のガイド RNA。

[104] 前記 3' 終端領域の前記 3' 末端における最後から 2 つ目および最後から 3 つ目のヌクレオチドのみが修飾されている、上記 [102] に記載のガイド RNA。 10

[105] 前記 3' 終端領域中の最後から 2 つ目、最後から 3 つ目、および最後から 4 つ目のヌクレオチドのみが修飾されている、上記 [102] に記載のガイド RNA。

[106] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 3 個、4 個、または 5 個のヌクレオチドの間に PS 結合をさらに含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[107] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されている、上記 [106] に記載のガイド RNA。

[108] 前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 3 個、4 個、または 5 個のヌクレオチドの間に PS 結合をさらに含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。 20

[109] 前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されている、上記 [108] に記載のガイド RNA。

[110] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 3 個または 4 個のヌクレオチド、および前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 3 個または 4 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[111] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 3 個または 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されており、かつ前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 3 個または 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されている、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。 30

[112] 前記 5' 終端の前記 5' 末端における最初の 3 個または 4 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含み、かつ PS 結合により連結されており、また前記 3' 終端の前記 3' 末端における最後の 3 個または 4 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含み、かつ PS 結合により連結されている、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[113] ヌクレオチド LS8、LS9、LS10、LS11、および LS12 のうちの少なくとも 2 つが 2' - O - Me 修飾を含む、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[114] 少なくとも LS8 および LS10 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。 40

[115] 前記ネクサス領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 50% が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[116] 前記ネクサス領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または 99% が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [115] に記載のガイド RNA。

[117] 少なくとも N2 ~ N6 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [115] に記載のガイド RNA。

[118] 前記ネクサス領域中の前記ヌクレオチドのうちの少なくとも 10 個が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [79] ~ [100] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。 50

[1 1 9] 少なくとも N 2 ~ N 6 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 1 5] に記載のガイド RNA。

[1 2 0] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 5 0 % が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [7 9] ~ [1 0 0] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[1 2 1] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 2 0] に記載のガイド RNA。

[1 2 2] B 2、B 3、および / または B 4 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 2 1] に記載のガイド RNA。

[1 2 3] 前記バルジ領域中の前記ヌクレオチドのうちの少なくとも 3 つが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [7 9] ~ [1 0 0] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[1 2 4] B 2、B 3、および / または B 4 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 2 3] に記載のガイド RNA。

[1 2 5] s g RNA である、上記 [7 9] ~ [1 2 4] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[1 2 6] d g RNA である、上記 [7 9] ~ [1 2 5] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[1 2 7] 前記ヘアピン 1 領域および前記ヘアピン 2 領域中の前記ヌクレオチドの少なくとも 5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % が 2 ' - O M e で修飾されている、上記 [8 1] または [8 2] に記載のガイド RNA。

[1 2 8] S . ピオゲネス (S . Pyogenes) の C a s 9 とリボ核タンパク質複合体を形成する、上記 [7 9] ~ [1 2 7] のいずれか 1 項に記載のガイド RNA。

[1 2 9] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、

- a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドと、
- b . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、
- c . ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、
- d . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間のヌクレオチドと、
- e . ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、

f . 3 ' 末端の 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドと、において 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、s g RNA。

[1 3 0] 前記 5 ' 末端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する P S 結合および前記 3 ' 末端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する P S 結合をさらに含む、上記 [1 2 9] に記載の s g RNA。

[1 3 1] 表 4 に描写される配列番号 3 5 0、3 5 1、3 5 2、または 3 5 3 に示される修飾パターンを有する、s g RNA。

[1 3 2] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、

- a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個、4 個、5 個、または 7 個のヌクレオチドと、
- b . 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、
- c . ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、
- d . ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間のヌクレオチドと、
- e . ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、

f . 3 ' 末端の 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドと、において 2 ' - O - M e 修飾ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、s g RNA。

[1 3 3] シングルガイド RNA (s g RNA) であって、

- a . 5 ' 末端の 5 ' 末端における最初の 3 個、4 個、5 個、または 7 個のヌクレオチドと、
- b . ヌクレオチド U S 1、U S 2、U S 3、U S 4、U S 5、U S 6、U S 7、U S 8、U S 9、U S 1 0、U S 1 1 および U S 1 2 のそれぞれと、
- c . ヌクレオチド H 1 - 1、H 1 - 2、H 1 - 3、H 1 - 4、H 1 - 5、H 1 - 6、H 1 - 7、H 1 - 8、H 1 - 9、H 1 - 1 0、H 1 - 1 1、および H 1 - 1 2 のそれぞれと、

10

20

30

40

50

- d. ヘアピン 1 とヘアピン 2 との間のヌクレオチドと、
- e. ヌクレオチド H 2 - 1、H 2 - 2、H 2 - 3、H 2 - 4、H 2 - 5、H 2 - 6、H 2 - 7、H 2 - 8、H 2 - 9、H 2 - 10、H 2 - 11、H 2 - 12、H 2 - 13、H 2 - 14、および H 2 - 15 のそれぞれと、
- f. 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドと、において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含むまたはそれからなる、sgRNA。
- [1 3 4] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する PS 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する PS 結合をさらに含む、上記 [1 2 9] ~ [1 3 3] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。
- [1 3 5] 表 4 に示されるような配列番号 3 5 0、3 5 1、3 5 2、または 3 5 3 の修飾パターンを有する、sgRNA。 10
- [1 3 6] S. ピオゲネス (S. Pyogenes) の Cas 9 とリボ核タンパク質複合体を形成する、上記 [1 2 9] ~ [1 3 5] のいずれか 1 項に記載の sgRNA。
- [1 3 7] crisper RNA (crRNA) であって、
- 以下の領域、すなわち、
- a. 5' 末端の 5' 末端における最初の 5 個のヌクレオチドと、
- b. 下部ステム領域と、
- c. バルジ領域と、
- d. 上部ステム領域；および
- e. 前記 crRNA の 3' 末端における最後の 5 個のヌクレオチドと、うちの 1 つまたは複数の領域内に 1 つまたは複数の修飾を含む、crRNA。 20
- [1 3 8] 5' 末端修飾をさらに含み、前記 5' 末端修飾が前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 7 個のヌクレオチド内に 1 つまたは複数のホスホロチオエート連結を含む、上記 [1 3 6] に記載の crRNA。
- [1 3 9] 5' 末端修飾をさらに含み、前記 5' 末端修飾が前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 7 個のヌクレオチド内に少なくとも 2 つのホスホロチオエート連結を含む、上記 [1 3 6] に記載の crRNA。
- [1 4 0] 少なくとも 1 つの修飾が 2' - O - メチル (2' - O - Me) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1 3 7] ~ [1 3 9] のいずれか 1 項に記載の crRNA。
- [1 4 1] 少なくとも 1 つの修飾が 2' - フルオロ (2' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1 3 7] ~ [1 4 0] のいずれか 1 項に記載の crRNA。 30
- [1 4 2] 少なくとも 1 つの修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (PS) 結合を含む、上記 [1 3 7] ~ [1 4 1] のいずれか 1 項に記載の crRNA。
- [1 4 3] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが修飾されている、上記 [1 3 7] ~ [1 4 2] のいずれか 1 項に記載の crRNA。
- [1 4 4] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチド、および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (PS) 結合により連結されている、上記 [1 3 7] ~ [1 4 3] のいずれか 1 項に記載の crRNA。 40
- [1 4 5] 前記修飾が 2' - O - Me を含む、上記 [1 4 3] に記載の crRNA。
- [1 4 6] 前記修飾が 2' - F を含む、上記 [1 4 3] に記載の crRNA。
- [1 4 7] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されており、かつ前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - O - Me 修飾を含む、上記 [1 3 7] ~ [1 4 6] のいずれか 1 項に記載の crRNA。
- [1 4 8] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが PS 結合により連結されており、かつ前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3' 末端の前 50

記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2' - F 修飾を含む、上記 [1 3 7] ~ [1 4 6] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 4 9] LS1 および LS6 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [1 3 7] ~ [1 4 8] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 0] 上部ステム領域中のヌクレオチドのそれぞれが 2' - O - Me で修飾されている、上記 [1 3 7] ~ [1 4 9] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 1] crispr RNA (crRNA) であって、

a. 下部ステム領域中の LS1 および LS6 と、

b. 上部ステム領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、crRNA。

[1 5 2] 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (PS) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1 5 1] に記載の crRNA。

[1 5 3] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含み、かつ前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [1 5 1] または上記 [1 5 2] に記載の crRNA。

[1 5 4] LS1、LS2、および LS6 が 2' - F で修飾されている、上記 [1 3 7] ~ [1 5 3] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 5] 前記バルジ領域中の各ヌクレオチドが 2' - F で修飾されている、上記 [1 3 7] ~ [1 5 4] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 6] crispr RNA (crRNA) であって、

a. 下部ステム領域中の LS1、LS2、および LS6 と、

b. バルジ領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - F 修飾ヌクレオチドを含む、crRNA。

[1 5 7] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (PS) 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1 3 7] ~ [1 5 6] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 8] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含み、かつ前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [1 3 7] ~ [1 5 7] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 5 9] 表 4 の修飾を含む配列番号 1 ~ 187 のうちのいずれか 1 つを含む、crRNA。

[1 6 0] 表 4 の修飾を含む配列番号 19 ~ 31、53 ~ 73、104 ~ 130、および 161 ~ 187 のうちのいずれか 1 つを含む、crRNA。

[1 6 1] 配列番号 19 ~ 31、53 ~ 73、104 ~ 130、および 161 ~ 187 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75、または 70 % の同一性を有する核酸を含み、表 4 中の参照配列識別子のヌクレオチドに対応する crRNA の各ヌクレオチドにおける修飾が表 4 における前記参照配列識別子に示される前記修飾と同一または同等である、crRNA。

[1 6 2] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (PS) 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの PS 結合をさらに含む、上記 [1 5 9] ~ [1 6 1] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

[1 6 3] trRNA と組み合わせさせた前記 crRNA が S. ピオゲネス (S. Pyogenes) の Cas9 とりボ核タンパク質複合体を形成する、上記 [1 3 7] ~ [1 6 2] のいずれか 1 項に記載の crRNA。

10

20

30

40

50

[1 6 4] t r a c r R N A (t r R N A)であって、

以下の領域：

a . 5 ' 終端の 5 ' 末端における最初の 5 個のヌクレオチドと、

b . 上部ステム領域と、

c . バルジ領域と、

d . 下部ステム領域と、

e . ネクサス領域と、

f . ヘアピン 1 領域と、

g . ヘアピン 2 領域と、

h . 3 ' 終端の 3 ' 末端における最後の 5 個のヌクレオチドと、のうちの 1 つまたは複数の領域内に 1 つまたは複数の修飾を含む、t r R N A。 10

[1 6 5] 少なくとも 1 つの修飾が 2 ' - O - メチル (2 ' - O - M e) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1 6 4] に記載の t r R N A。

[1 6 6] 少なくとも 1 つの修飾が 2 ' - フルオロ (2 ' - F) 修飾ヌクレオチドを含む、上記 [1 6 4] または上記 [1 6 5] に記載の t r R N A。

[1 6 7] 少なくとも 1 つの修飾がヌクレオチド間のホスホロチオエート (P S) 結合を含む、上記 [1 6 4] ~ [1 6 6] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 6 8] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチド、および前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドがホスホロチオエート (P S) 結合により連結されている、上記 [1 6 4] ~ [1 6 7] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。 20

[1 6 9] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 6 8] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 0] 前記修飾が 2 ' - O - M e を含む、上記 [1 6 9] に記載の t r R N A。

[1 7 1] 前記修飾が 2 ' - F を含む、上記 [1 6 9] に記載の t r R N A。

[1 7 2] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2 ' - O - M e 修飾を含む、上記 [1 6 4] ~ [1 7 1] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。 30

[1 7 3] 前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドが P S 結合により連結されており、かつ前記 5 ' 終端の前記 5 ' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドおよび前記 3 ' 終端の前記 3 ' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドが 2 ' - F 修飾を含む、上記 [1 6 4] ~ [1 7 1] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 4] 前記上部ステム領域中の各ヌクレオチドが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 7 3] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 5] 前記バルジ領域内の B 1 および B 2 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 7 4] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。 40

[1 7 6] 前記ネクサス領域中の N 3、N 4、N 5、N 1 5、N 1 6、N 1 7、および / または N 1 8 が 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 7 5] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 7] 前記ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 7 6] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 8] 前記ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドが 2 ' - O - M e で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 7 7] のいずれか 1 項に記載の t r R N A。

[1 7 9] t r a c r R N A (t r R N A)であって、

a . 上部ステム中の各ヌクレオチドと、

b . バルジ領域内の B 1 および / または B 2 と、 50

c. ネクサス領域中の N 3、N 4、N 5、N 1 5、N 1 6、N 1 7、および / または N 1 8 と、

d. ヘアピン 1 領域中の各ヌクレオチドと、

e. ヘアピン 2 領域中の各ヌクレオチドと、において 2' - O - Me 修飾ヌクレオチドを含む、t r RNA。

[1 8 0] 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (P S) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、上記 [1 7 9] に記載の t r RNA。

[1 8 1] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含み、かつ前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾核酸をさらに含む、上記 [1 7 9] または上記 [1 8 0] に記載の t r RNA。 10

[1 8 2] N 1 5、N 1 6、N 1 7、および N 1 8 が 2' - F で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 8 1] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。

[1 8 3] L S 1、L S 3、および L S 5 が 2' - F で修飾されており、かつ L S 2、L S 4、および L S 6 が 2' - O - Me で修飾されている、上記 [1 6 4] ~ [1 8 2] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。

[1 8 4] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (P S) 結合および前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、上記 [1 6 4] ~ [1 8 3] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。 20

[1 8 5] 前記 5' 末端の前記 5' 末端における最初の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含み、かつ前記 3' 末端の前記 3' 末端における最後の 3 個のヌクレオチドにおいて 2' - O - Me または 2' - F 修飾ヌクレオチドをさらに含む、上記 [1 6 4] ~ [1 8 4] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。

[1 8 6] 表 4 の修飾を含む配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つを含む、t r RNA。

[1 8 7] 配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つに対して少なくとも 9 9、9 8、9 7、9 6、9 5、9 4、9 3、9 2、9 1、9 0、8 5、8 0、7 5、または 7 0 % の同一性を有する核酸を含み、表 4 中の参照配列識別子のヌクレオチドに対応する t r RNA の各ヌクレオチドにおける修飾が表 4 における参照配列識別子に示される前記修飾と同一または同等である、t r RNA。 30

[1 8 8] 5' 末端の 5' 末端における最初の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つのホスホ口チオエート (P S) 結合および 3' 末端の 3' 末端における最後の 4 個のヌクレオチドを連結する 3 つの P S 結合をさらに含む、上記 [1 8 6] ~ [1 8 7] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。

[1 8 9] c r RNA と組み合わせさせた前記 t r RNA が S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 とリボ核タンパク質複合体を形成する、上記 [1 6 4] ~ [1 8 8] のいずれか 1 項に記載の t r RNA。

[1 9 0] c r RNA および t r RNA を含むデュアルガイドであって、前記 c r RNA が表 4 に描写される配列番号 1 ~ 1 8 7 のうちのいずれか 1 つを含み、かつ前記 t r RNA が表 4 に描写される配列番号 1 8 8 ~ 2 2 7 のうちのいずれか 1 つの核酸を含む、デュアルガイド。 40

[1 9 1] 上記 [1 3 7] ~ [1 6 3] のいずれか 1 項に記載の c r RNA および上記 [1 6 4] ~ [1 8 9] のいずれか 1 項に記載の t r RNA を含む、デュアルガイド。

[1 9 2] 上記 [1 3 7] ~ [1 6 3] のいずれか 1 項に記載の c r RNA および非修飾 t r RNA を含む、デュアルガイド。

[1 9 3] 非修飾 c r RNA および上記 [1 3 7] ~ [1 8 9] のいずれか 1 項に記載の t r RNA を含む、デュアルガイド。

[1 9 4] S . ピオゲネス (S. Pyogenes) の C a s 9 とリボ核タンパク質複合体を形 50

成する、上記[190]～[193]のいずれか1項に記載のデュアルガイド。

[195] 上記[1]～[78]および[129]～[136]のいずれか1項に記載のsgRNAを含む、LNP組成物。

[196] 上記[1]～[193]のいずれか1項に記載の前記RNAを含むまたはそれからなるgRNAを含む、LNP組成物。

[197] 脂質ナノ粒子(LNP)と会合した上記[1]～[78]および[129]～[136]のいずれか1項に記載のsgRNAを含む、組成物。

[198] 脂質ナノ粒子(LNP)と会合した上記[137]～[163]のいずれか1項に記載のcrRNAを含む、組成物。

[199] 脂質ナノ粒子(LNP)と会合した上記[164]～[189]のいずれか1項に記載のtrRNAを含む、組成物。

10

[200] 上記[1]～[78]および[129]～[136]のいずれか1項に記載の前記sgRNA、上記[79]～[128]のいずれか1項に記載の前記gRNA、上記[137]～[163]のいずれか1項に記載の前記crRNA、上記[164]～[189]のいずれか1項に記載の前記trRNA、上記[190]～[194]のいずれか1項に記載の前記dgRNA、または上記[195]～[199]のいずれか1項に記載の前記組成物を含み、ヌクレアーゼまたは前記ヌクレアーゼをコードするmRNAをさらに含む、組成物。

[201] 前記ヌクレアーゼがCasタンパク質である、上記[200]に記載の組成物。

20

[202] 前記Casタンパク質がCas9である、上記[201]に記載の組成物。

[203] 前記Cas9がS.ピオゲネス(S. Pyogenes)のCas9である、上記[202]に記載の組成物。

[204] 前記ヌクレアーゼがニッカーゼである、上記[200]～[203]のいずれか1項に記載の組成物。

[205] 前記ヌクレアーゼが改変されている、上記[200]～[204]のいずれか1項に記載の組成物。

[206] 前記改変されているヌクレアーゼが核局在シグナル(NLS)を含む、上記[205]に記載の組成物。

[207] 前記ヌクレアーゼをコードするmRNAを含む、上記[200]～[206]のいずれか1項に記載の組成物。

30

[208] 上記[1]～[78]および[129]～[136]のいずれか1項に記載のsgRNA、上記[79]～[128]のいずれか1項に記載のgRNA、上記[137]～[163]のいずれか1項に記載のcrRNA、上記[164]～[189]のいずれか1項に記載のtrRNA、上記[190]～[194]のいずれか1項に記載のdgRNA、または上記[195]～[207]のいずれか1項に記載の組成物と、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬製剤。

[209] 標的DNAを改変する方法であって、

Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸と、以下：

a. 上記[1]～[78]および[129]～[136]のいずれか1項に記載のsgRNA；

40

b. 上記[79]～[128]のいずれか1項に記載のgRNA；

c. 上記[137]～[163]のいずれか1項に記載のcrRNA；

d. 上記[164]～[189]のいずれか1項に記載のtrRNA；

e. 上記[190]～[194]のいずれか1項に記載のdgRNA；

f. 上記[195]～[207]のいずれか1項に記載の組成物；または

g. 上記[208]に記載の医薬製剤のうちのいずれか1つまたは複数と、を細胞に送達することを含む、方法。

[210] 遺伝子中の挿入または欠失を結果としてもたらす、上記[209]に記載の方法。

50

〔 2 1 1 〕 前記細胞に鋳型を送達することをさらに含み、前記鋳型の少なくとも一部が、C a s タンパク質により誘導される二本鎖切断部位においてまたはその近くにおいて標的DNAの中へと組み込まれる、上記〔 2 0 9 〕に記載の方法。

〔 2 1 2 〕 疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するための、上記〔 1 〕～〔 7 8 〕および〔 1 2 9 〕～〔 1 3 6 〕のいずれか1項に記載のs g RNA。

〔 2 1 3 〕 疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するための、上記〔 7 3 7 〕～〔 1 6 3 〕のいずれか1項に記載のc r RNA。

〔 2 1 4 〕 疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するための、上記〔 1 6 4 〕～〔 1 8 9 〕のいずれか1項に記載のt r RNA。

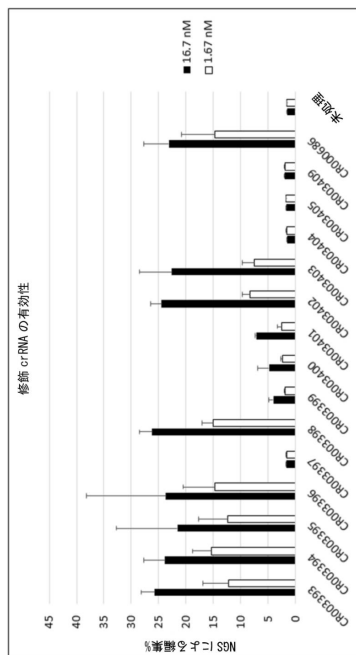
〔 2 1 5 〕 疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するために、上記〔 1 6 4 〕～〔 1 8 9 〕のいずれか1項に記載のt r RNAと組み合わせた、上記〔 1 3 7 〕～〔 1 6 3 〕のいずれか1項に記載のc r RNA。

〔 2 1 6 〕 疾患または障害を治療するための薬剤の調製において使用するための、上記〔 2 0 8 〕に記載の医薬製剤。

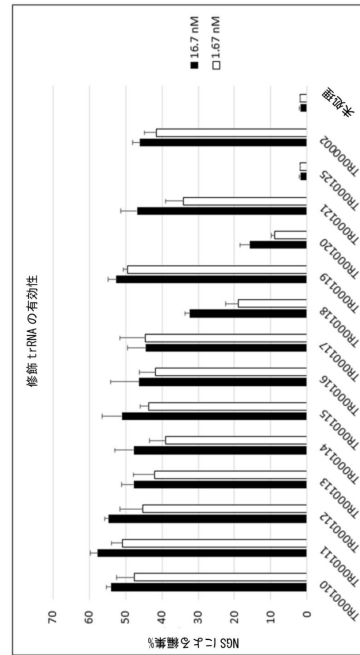
10

【図面】

【図 1】



【図 2】



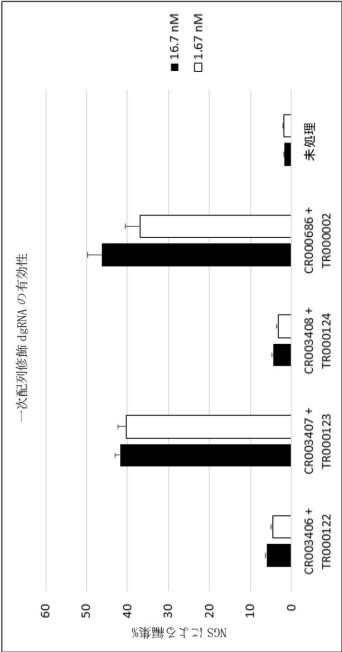
20

30

40

50

【図 3】



【図 4】

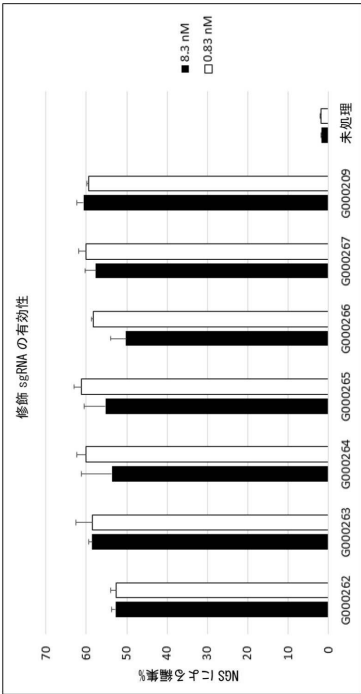
25 nM		TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002
CR003393	54.1 ± 5.5	61.2 ± 3.1	56.7 ± 5.5	55.9 ± 4.4	53.8 ± 10.7	56.3 ± 1.0	52.7 ± 5.8	55.5 ± 1.7	40.7 ± 12.9	48.5 ± 8.1	51.3 ± 11.4		
CR003394	57.7 ± 4.7	61.5 ± 8.2	64.8 ± 6.4	65.4 ± 8.9	60.1 ± 2.5	61.6 ± 4.6	57.3 ± 7.2	57.8 ± 8.3	38.6 ± 7.9	50.9 ± 10.3	54.8 ± 8.9		
CR003395	52.4 ± 2.4	62.8 ± 6.8	61.1 ± 7.2	62.8 ± 11.1	55.9 ± 7.6	57 ± 4.9	53.4 ± 7.1	52.5 ± 8.1	38.2 ± 7.5	49.7 ± 14.4	53.1 ± 11.7		
CR003396	56 ± 3.9	56.4 ± 7.6	56.7 ± 7.3	58.1 ± 7.3	54.7 ± 4.9	58.8 ± 5	48.9 ± 2.8	52.5 ± 9.7	34.3 ± 6	48.3 ± 10.3	52.4 ± 5.5		
CR003398	50.8 ± 10.2	56.2 ± 8.2	62.5 ± 6.9	59.7 ± 8.9	56.3 ± 3.4	61.2 ± 5	53 ± 7.1	53.8 ± 9.2	29.4 ± 9.3	52.2 ± 12.2	51.9 ± 15.6		
CR003402	42.7 ± 4.5	53.3 ± 5.4	56.9 ± 1.1	57.4 ± 12.1	52.8 ± 9.3	55.1 ± 8.5	46.1 ± 8.4	50.5 ± 8.8	17.7 ± 6.7	45.2 ± 1.2	52.8 ± 11.3		
CR003403	45.8 ± 9.9	52.7 ± 8.6	55.7 ± 13.9	54.8 ± 13.7	47.2 ± 12.1	50.9 ± 8.4	43.4 ± 10.3	47.2 ± 13	10.5 ± 5.9	44.5 ± 15.2	36 ± 19.3		
CR000686												34.5 ± 6.4	

2.5 nM		TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002
CR003393	41.8 ± 6.2	50.4 ± 3.2	40.2 ± 4.7	43.4 ± 4.2	40.1 ± 4.8	43.1 ± 3.9	59.1 ± 4.2	43 ± 6	15.6 ± 3.1	34.9 ± 11.6	38.6 ± 2.2		
CR003394	45.4 ± 4.7	49.6 ± 7.9	43.9 ± 6.6	46.7 ± 5.6	40.4 ± 7.5	47.2 ± 6.9	46.8 ± 3.1	43.9 ± 2.4	13.7 ± 1.6	28.9 ± 4.3	35.9 ± 6.2		
CR003395	39 ± 10	56 ± 5.1	42.2 ± 3.5	36.2 ± 3.2	36 ± 2.8	47.4 ± 7.3	46.4 ± 5.9	41.6 ± 7	12 ± 1.4	25.8 ± 1	31.4 ± 1.8		
CR003396	34.8 ± 2.3	46.5 ± 0.4	42 ± 4.9	42.4 ± 1.8	32 ± 4	44.4 ± 5.5	41.1 ± 7.7	40.5 ± 5.1	20.7 ± 1.2	26 ± 1.2	42.4 ± 8.9		
CR003398	33.6 ± 3.3	47 ± 6.8	41.9 ± 2.6	41.9 ± 1.1	37.1 ± 4.1	43.2 ± 9.4	40.1 ± 3.9	42.9 ± 3.6	1.4 ± 0.1	34.2 ± 2	40.7 ± 7.4		
CR003402	31.2 ± 3.7	46.4 ± 5	38.5 ± 2.8	40.7 ± 3.5	29.9 ± 1.1	42.4 ± 6.6	31.7 ± 2.9	32.8 ± 4.6	7 ± 0.8	31.3 ± 2.1	46.8 ± 3.8		
CR003403	28 ± 4.3	36.3 ± 3.3	37.5 ± 4.8	36.4 ± 2.7	31.4 ± 4.6	34.6 ± 3.7	32.9 ± 4	35.8 ± 4.2	1.4 ± 0.1	34.6 ± 6.1	40.7 ± 6.6		
CR000686												21.7 ± 4.9	

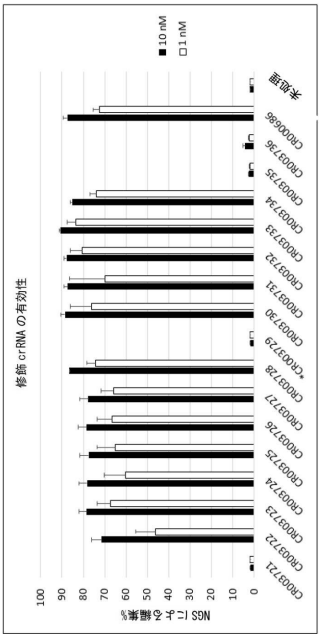
10

20

【図 5】



【図 6】

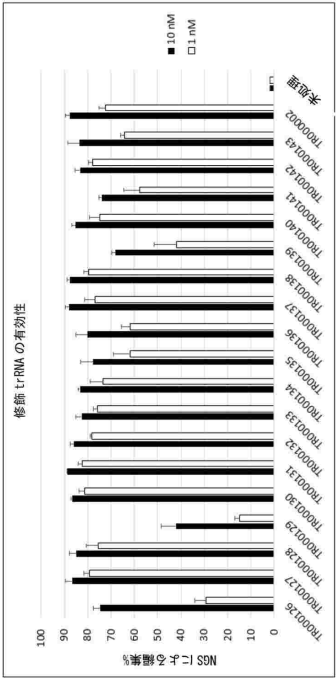


30

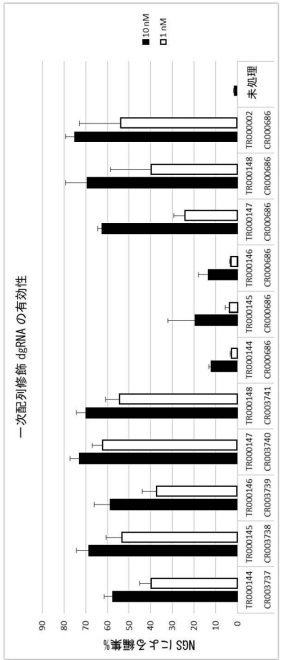
40

50

【図 7】



【図 8】

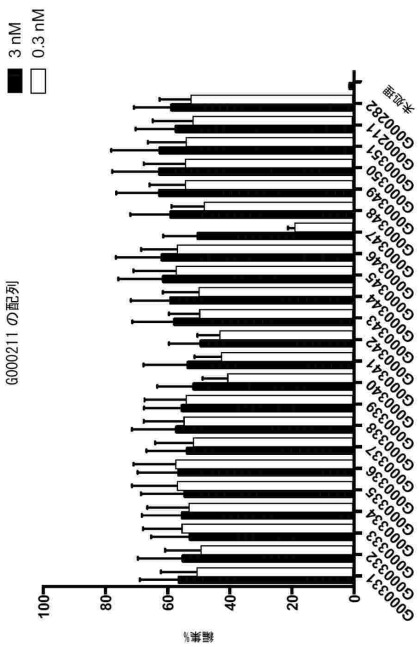


【図 9】

10 nM	TMO00127	TMO00128	TMO00129	TMO00130	TMO00131	TMO00132	TMO00133	TMO00134	TMO00135	TMO00136	TMO00137	TMO00138	TMO00139	TMO00140	TMO00141	TMO00142	TMO00143	TMO00144
NGS による編集率 (%)	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1
標準偏差	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

1 nM	TMO00127	TMO00128	TMO00129	TMO00130	TMO00131	TMO00132	TMO00133	TMO00134	TMO00135	TMO00136	TMO00137	TMO00138	TMO00139	TMO00140	TMO00141	TMO00142	TMO00143	TMO00144
NGS による編集率 (%)	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1	85.1
標準偏差	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

【図 10】



10

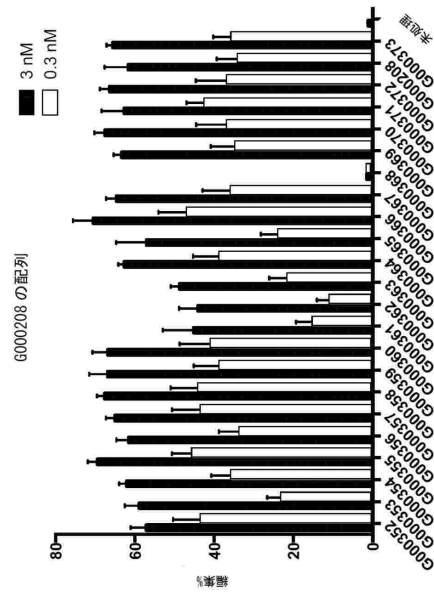
20

30

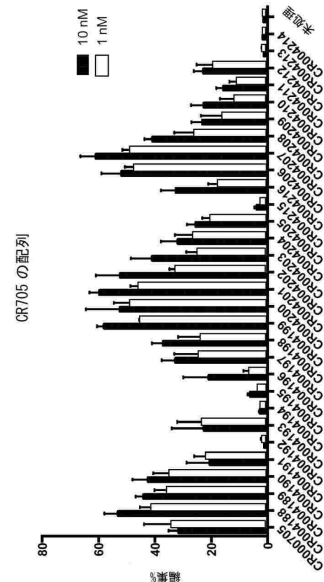
40

50

【図 1 1】

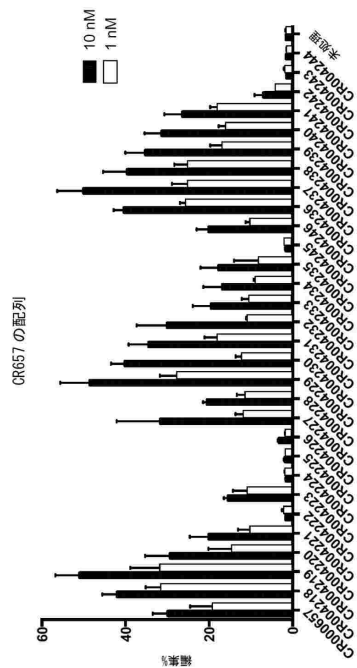


【図 1 2 A】

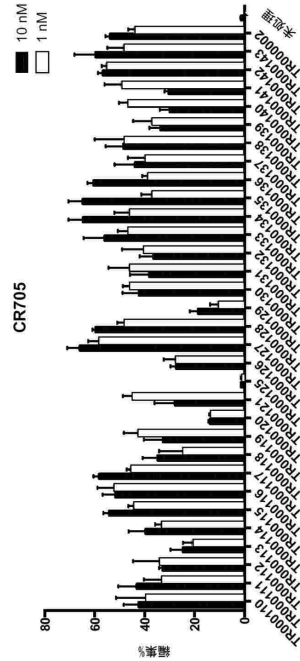


10

【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



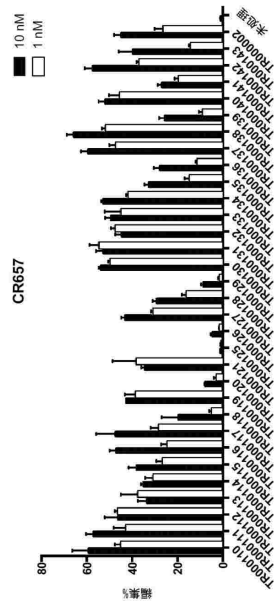
20

30

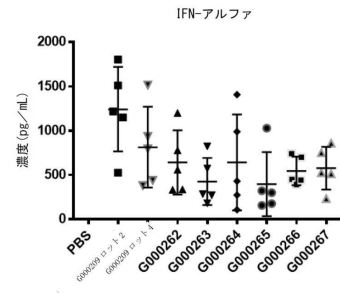
40

50

【図 1 3 B】

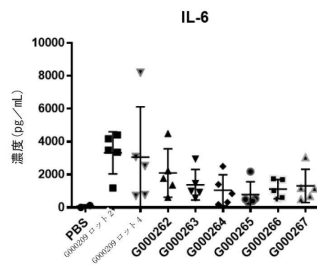


【図 1 4 A】

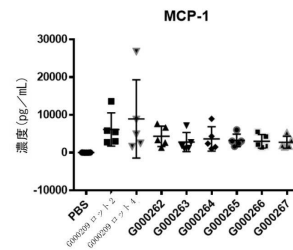


10

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



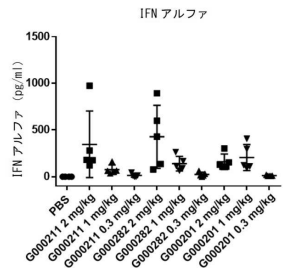
20

30

40

50

【図 1 6 A】



【図 1 6 B】

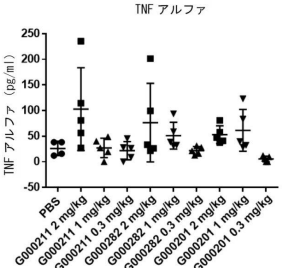
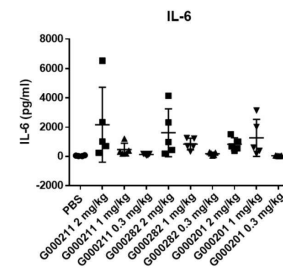


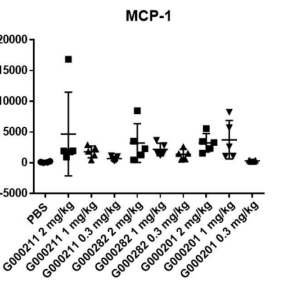
図 1 6 B

10

【図 1 6 C】

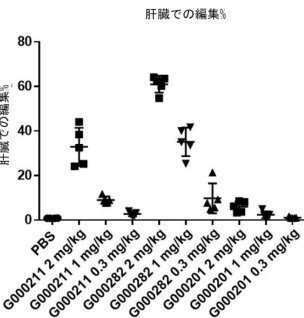


【図 1 6 D】



20

【図 1 7 A】



【図 1 7 B】

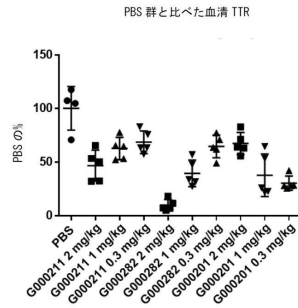
	平均編集%	標準偏差
PBS	0.8370155	0.03184162
G211 2 mg/kg	32.89082	8.520595
G211 1 mg/kg	9.024511	1.640143
G211 0.3 mg/kg	2.762495	0.9668095
G282 2 mg/kg	60.99886	3.792423
G282 1 mg/kg	35.13641	6.434229
G282 0.3 mg/kg	9.812781	6.713302
G284 2 mg/kg	6.007987	2.434861
G284 1 mg/kg	2.413099	1.540902
G284 0.3 mg/kg	1.130903	0.3189707

30

40

50

【図 17 C】

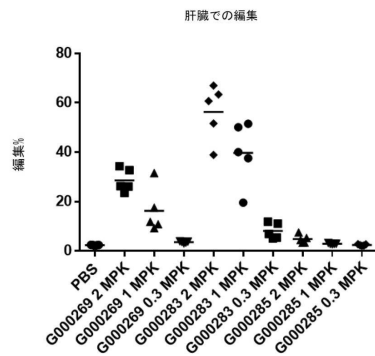


【図 17 D】

	TTR 低減の平均%	標準偏差
PBS	100.000	20.31276
G211 2 mg/kg	46.73565	14.33137
G211 1 mg/kg	62.66805	10.30656
G211 0.3 mg/kg	68.51203	10.40399
G282 2 mg/kg	9.890765	5.288372
G282 1 mg/kg	39.58118	12.35095
G282 0.3 mg/kg	64.59702	10.51861
G284 2 mg/kg	67.28742	10.217
G284 1 mg/kg	37.76873	19.77835
G284 0.3 mg/kg	30.4822	6.612638

10

【図 18 A】

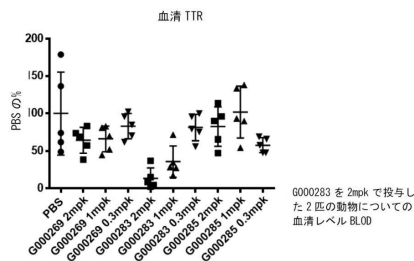


【図 18 B】

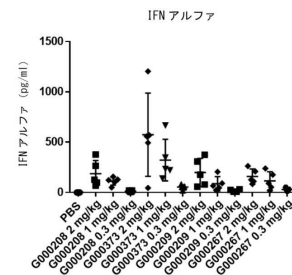
ガイド	用量	平均編集%
PBS		2.38
G269	2 MPK	28.57
	1 MPK	16.21
	0.3 MPK	3.54
G283	2 MPK	56.32
	1 MPK	39.73
	0.3 MPK	8.08
G285	2 MPK	4.80
	1 MPK	2.90
	0.3 MPK	2.44

20

【図 18 C】



【図 19 A】

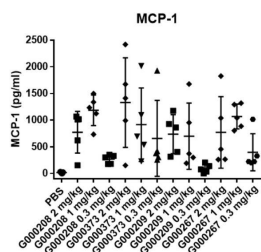


30

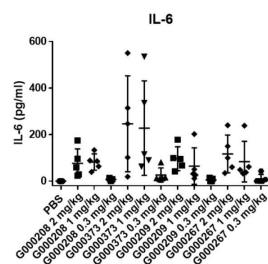
40

50

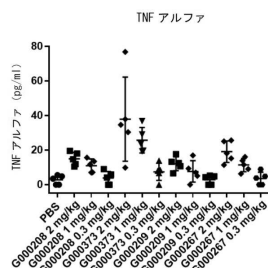
【 図 1 9 B 】



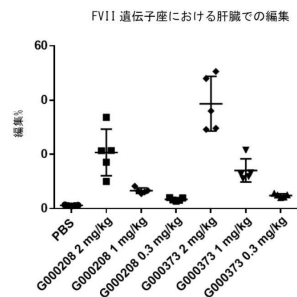
【 図 1 9 C 】



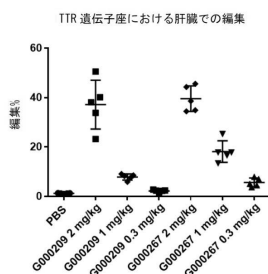
【 図 1 9 D 】



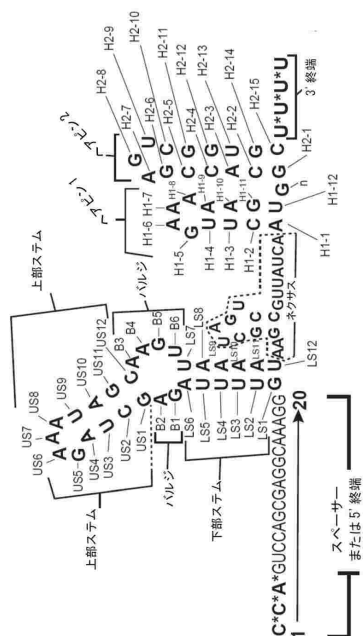
【 図 2 0 A 】



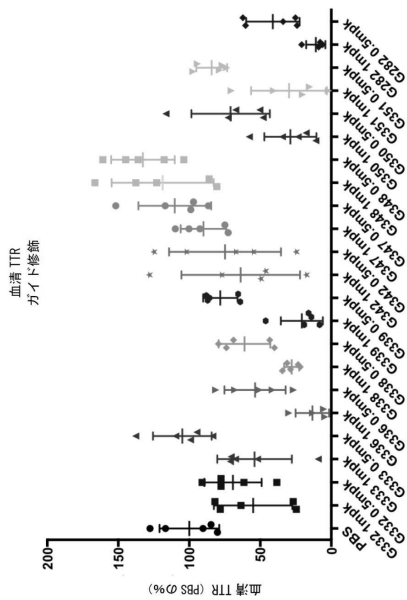
【 図 2 0 B 】



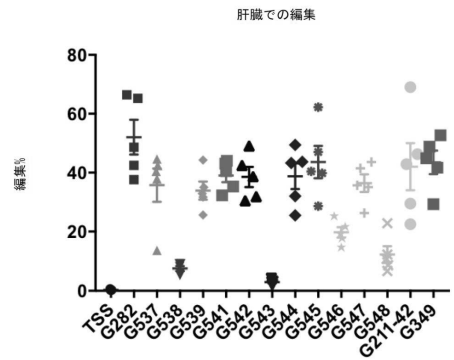
【図 2 1 A】



【図 2 2 C】



【図 2 3 A】

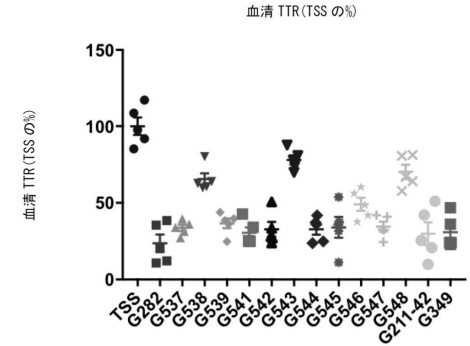


10

【図 2 3 B】

ガイド	平均編集%
TSS	0.32
G282	52.06
G537	35.78
G538	7.5
G539	33.9
G541	39.04
G542	38.54
G543	2.96
G544	38.78
G545	43.6
G546	19.74
G547	36.44
G548	12.2
G211-42	42.04
G349	43.48

【図 2 3 C】

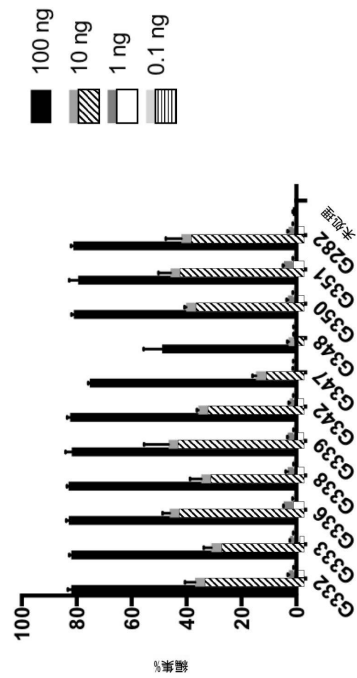


30

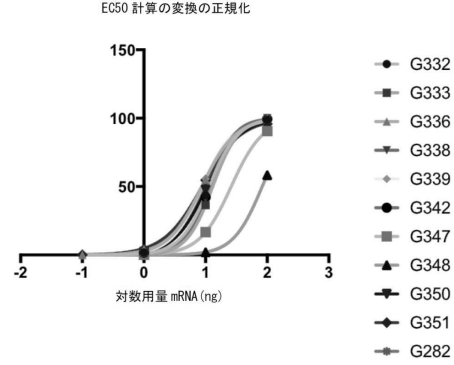
40

50

【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 B 】



10

【 図 2 4 C 】

ガイド	EC50
G332	11.42
G333	13.07
G336	8.735
G338	11.80
G339	8.778
G342	11.60
G347	26.07
G348	83.09
G350	10.57
G351	8.797
G282	10.04

20

【 配列表 】

0007696694000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 H 21/02 (2006.01)

F I

A 6 1 P

43/00

1 2 1

C 0 7 H

21/02

Z N A

(72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , エリー ストリート 4 0
モリッシー , デイビッド ブイ .

(72)発明者 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , エリー ストリート 4 0
ストラップス , ウォルター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ , エリー ストリート 4 0

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 名和 大輔

審判官 中村 浩

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 9 4 3 3 (W O , A 1)

特表 2 0 1 9 - 5 1 6 3 5 1 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9