

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-522756

(P2022-522756A)

(43)公表日 令和4年4月20日(2022.4.20)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02		4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 7
A 6 1 K	38/39 (2006.01)	A 6 1 K	38/39		
A 6 1 K	38/50 (2006.01)	A 6 1 K	38/50		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全111頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-551562(P2021-551562)	(71)出願人	597160510		
(86)(22)出願日	令和2年2月27日(2020.2.27)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年10月14日(2021.10.14)		REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/020134		アメリカ合衆国10591-6707ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード777番		
(87)国際公開番号	WO2020/176747	(74)代理人	100108453		
(87)国際公開日	令和2年9月3日(2020.9.3)		弁理士 村山 靖彦		
(31)優先権主張番号	62/878,865	(74)代理人	100110364		
(32)優先日	令和1年7月26日(2019.7.26)		弁理士 実広 信哉		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100133400		
(31)優先権主張番号	62/812,017		弁理士 阿部 達彦		
(32)優先日	平成31年2月28日(2019.2.28)	(72)発明者	アン・ジェイ・リゴッキ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(31)優先権主張番号	62/831,838				
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 治療薬の送達のためのアデノ随伴ウイルスベクター

(57)【要約】

本明細書で提供されるのは、AAVベクターを使用して治療薬を眼に選択的に送達するための方法である。例えば、角膜は、記載された方法を使用して具体的に標的化されることができる。また、本明細書で提供されるのは、CRISPR複合体と共にパッケージされたAAVベクターを含む組成物であり、これは、眼、例えば角膜、特に角膜内皮に直接送達されることができる。角膜内皮（例えば、FEC D）などの眼の組織の異常または劣化を含む疾患および状態は、本明細書に記載の方法および組成物を使用して治療されることができる。

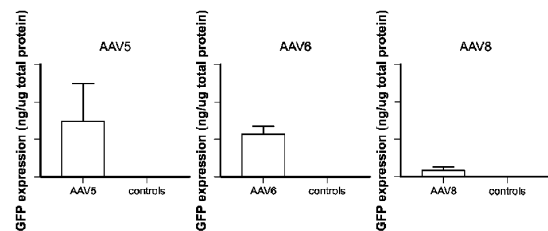


FIG. 9

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) A A V ベクターのヌクレオチド配列またはその一部と、
b) 角膜の疾患もしくは状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも 1 つのヌクレオチド配列、前記角膜の疾患もしくは状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸、および／または眼で発現されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列またはその一部を含む、核酸編集システムと、を含む、組成物。

【請求項 2】

前記タンパク質が、他の眼組織または細胞と比較して、前記眼の前部で優先的に発現される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質が、他の眼組織または細胞と比較して、前記角膜で優先的に発現される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記タンパク質が、転写因子、コラーゲン、ヌクレアーゼ、または蛍光タンパク質である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記タンパク質が転写因子 4 (T C F 4) である、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記核酸編集システムが C R I S P R システムである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記核酸編集システムが C R I S P R - C a s システムである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

C R I S P R - C a s システムが、C R I S P R 関連 (C a s) 遺伝子をコードするヌクレオチド配列およびガイド RNA (g R N A) をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

C R I S P R - C a s システムが C R I S P R - C a s 9 システムである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記ヌクレオチド配列が g R N A である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス RNA、またはアンタゴミール RNA から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記変異体対立遺伝子が、前記標的遺伝子上の標的配列によってコードされる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、対象の細胞内の前記標的遺伝子上の標的配列にハイブリダイズする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記標的遺伝子が T C F 4 または C O L 8 A 2 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 15】

少なくとも 1 つの標的配列が、配列番号 1 ~ 1 0 8 4 からなる群から選択される、請求項

10

20

30

40

50

1 に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの標的配列が T C F 4 遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号 1 ～ 190 から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記標的配列が C O L 8 A 2 遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号 191 ～ 1084 から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 18】

少なくとも 1 つのガイド RNA が、配列番号 1 ～ 1084 から選択される少なくとも 1 つの標的配列に相補的である c r RNA 配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 19】

少なくとも 1 つのガイド RNA が、配列番号 1089 ～ 1278 からなる群から選択されるガイド配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記編集システムが修復テンプレートをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記修復テンプレートが、DNA 修復テンプレート、mRNA 修復テンプレート、siRNA 修復テンプレート、miRNA 修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

20

AAV ベクター血清型が、AAV5、AAV6、および AAV8 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 23】

AAV ベクター血清型が AAV5 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 24】

AAV ベクター血清型が AAV6 である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 25】

AAV ベクター血清型が AAV8 である、請求項 1 に記載の組成物

【請求項 26】

前記組成物がプロモーターをさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 27】

プロモーターが、AAV5、AAV6、または AAV8 ベクターと共に使用するために最適化されている、請求項 24 に記載の組成物。

【請求項 28】

前記プロモーターが、組織特異的であり、前記 AAV ベクター、または標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、前記眼において活性である、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜において活性である、請求項 28 に記載の組成物。

40

【請求項 30】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜の内皮において活性である、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記標的遺伝子が、前房内 (IC) 注射後に前記眼の前部で優先的に発現される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記角膜の前記疾患または状態が、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである、請求項 1 に記載の組成物。

50

【請求項 3 3】

前記角膜の前記疾患または状態が後部角膜ジストロフィーである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記後部角膜ジストロフィーが、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（P P C D；1 型、2 型、および 3 型）、先天性内皮ジストロフィー（1 型および 2 型）、および X 連鎖内皮角膜ジストロフィーからなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記角膜ジストロフィーが F E C D である、請求項 3 4 に記載の組成物。

10

【請求項 3 6】

前記タンパク質が、他の眼組織または細胞と比較して、前記眼の後部で優先的に発現される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

A A V ベクター血清型が、A A V 2 および A A V 9 からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

タンパク質を、それを必要とする対象の眼において発現する方法であって、

a) 前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のアデノ随伴（A A V）ベクターを提供することと、

20

b) 前記 A A V ベクターを前記眼に投与することを含む、方法。

【請求項 3 9】

前記タンパク質が、前記眼の他の部分と比較して、前記眼の前部で優先的に発現される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記タンパク質が、前記眼の他の組織または細胞と比較して、角膜で優先的に発現される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記タンパク質が、前記眼の他の組織または細胞と比較して、前記角膜の内皮細胞で優先的に発現される、請求項 4 0 に記載の方法。

30

【請求項 4 2】

A A V ベクター血清型が、A A V 5、A A V 6、および A A V 8 からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 A A V ベクター血清型が A A V 5 である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 A A V ベクター血清型が A A V 6 である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 A A V ベクター血清型が A A V 8 である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記タンパク質が C a s タンパク質である、請求項 3 8 に記載の方法。

40

【請求項 4 7】

前記タンパク質が C a s 9 である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記タンパク質が、転写因子、コラーゲン、ヌクレアーゼ、または蛍光タンパク質である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記タンパク質が転写因子 4（T C F 4）である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記ベクターが修復テンプレートをさらに含む、請求項 3 8 に記載の方法。

50

【請求項 5 1】

前記修復テンプレートが、DNA 修復テンプレート、mRNA 修復テンプレート、siRNA 修復テンプレート、miRNA 修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記ベクターがプロモーターをさらに含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記プロモーターが、AAV 5、AAV 6、または AAV 8 ベクターと共に使用するために最適化されている、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記プロモーターが組織特異的であり、前記 AAV ベクター、または標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、前記眼において活性である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

組織特異的プロモーターが角膜において活性である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

組織特異的プロモーターが角膜の内皮において活性である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ベクターが、前記眼への注射を介して対象に投与される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記ベクターが、前記眼の前部への注射を介して前記対象に投与される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ベクターが、角膜実質、角膜輪部、角膜の上皮表面、または前記角膜の内皮膜に投与される、請求項 5 7 に記載の方法

【請求項 6 0】

前記ベクターが前房内（IC）注射を介して前記対象に投与される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記タンパク質が、IC 注射後の他の眼組織または細胞と比較して角膜で優先的に発現される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記タンパク質が、IC 注射後の眼組織または細胞と比較して、角膜内皮細胞で優先的に発現される、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記眼の疾患または状態を治療するのに適している、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記眼の前記疾患または状態が角膜の疾患または状態である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記角膜の前記疾患または状態が、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記角膜の前記疾患または状態が後部角膜ジストロフィーである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記後部角膜ジストロフィーがフックス内皮角膜ジストロフィー（FEC D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（PPCD；1 型、2 型、および 3 型）、先天性内皮ジストロフィー（1 型および 2 型）、および X 連鎖内皮角膜ジストロフィーである、請求項 6 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 68】

前記角膜ジストロフィーが F E C D である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記タンパク質が、前記眼の他の部分と比較して、前記眼の後部で優先的に発現される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 70】

A A V ベクター血清型が、A A V 2 および A A V 9 からなる群から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

角膜で発現される遺伝子の修復を必要とする対象においてそれを行うための方法であって 10

a) 前記角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸編集システムを含む送達システムを提供することと、

b) 前記対象の前記角膜に前記送達システムを投与することを含む、方法。

【請求項 72】

前記核酸編集システムが C R I S P R - C a s システムである、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記 C R I S P R - C a s システムが C R I S P R - C a s 9 システムである、請求項 72 に記載の方法。 20

【請求項 74】

少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記ヌクレオチド配列が g R N A である、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 75】

標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス R N A、またはアンタゴミール R N A から選択される、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 76】

前記変異体対立遺伝子が、前記標的遺伝子上の標的配列によってコードされる、請求項 71 に記載の方法。 30

【請求項 77】

標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である前記少なくとも 1 つのヌクレオチド配列が、前記対象の細胞内の前記標的遺伝子上の標的配列にハイブリダイズする、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 78】

前記標的遺伝子が T C F 4 または C O L 8 A 2 である、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 79】

少なくとも 1 つの標的配列が、配列番号 1 ~ 1 0 8 4 からなる群から選択される、請求項 71 に記載の方法。 40

【請求項 80】

少なくとも 1 つの標的配列が T C F 4 遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号 1 ~ 1 9 0 から選択される、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 81】

標的配列が C O L 8 A 2 遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号 1 9 1 ~ 1 0 8 4 から選択される、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 82】

前記送達システムが修復テンプレートをさらに含む、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 83】

前記修復テンプレートが、D N A 修復テンプレート、m R N A 修復テンプレート、s i R 50

N A 修復テンプレート、m i R N A 修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記 g R N A が、前記対象の細胞内の前記標的遺伝子の標的配列にハイブリダイズする、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記送達システムがプロモーターをさらに含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記プロモーターが、A A V 5、A A V 6、または A A V 8 ベクターと共に使用するために最適化されている、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記プロモーターが、組織特異的であり、前記 A A V ベクターまたは標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、眼において活性である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜において活性である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜の内皮において活性である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記送達システムが、眼への注射を介して前記対象に投与される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記送達システムが、眼の前部への注射を介して前記対象に投与される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記送達システムが、角膜実質、角膜輪部、前記角膜の上皮表面、または前記角膜の内皮膜に投与される、請求項 7 1 に記載の方法

【請求項 9 3】

前記送達システムが前房内注射を介して前記対象に投与される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 4】

眼の疾患または状態を治療するのに適している、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記眼の前記疾患または状態が前記角膜の疾患または状態である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記角膜の前記疾患または状態が、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記角膜の前記疾患または状態が後部角膜ジストロフィーである、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記後部角膜ジストロフィーが、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（P P C D；1 型、2 型、および 3 型）、先天性内皮ジストロフィー（1 型および 2 型）、および X 連鎖内皮角膜ジストロフィーからなる群から選択される、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記角膜ジストロフィーが F E C D である、請求項 9 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 100】

トリヌクレオチドリピート (TNR) および／または点変異を含む遺伝子の変異体対立遺伝子によって引き起こされる角膜の疾患または状態の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

a) 前記遺伝子内の前記トリヌクレオチドリピート (TNR) の少なくとも一部を切除することであって、

i) TNR、TNRの5'、TNRの3'、もしくはそれらの組み合わせ内の配列を標的とする1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含むAAV5、AAV6、またはAAV8ベクターを提供することと、

ii) 前記ベクターを前記角膜に投与することを含む、切除すること、および／あるいは

b) 前記遺伝子または遺伝子産物の点変異を修正することであって、

i) 前記遺伝子産物の点変異に関連する前記遺伝子の配列を標的とする1つ以上のCRISPRガイドRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含むAAV5、AAV6、またはAAV8ベクターを提供することと、

ii) 前記ベクターを前記角膜に投与することとを含む、修正することを含み前記1つ以上のヌクレオチド配列が前記角膜で優先的に発現される、方法。

【請求項 101】

標的遺伝子がTCF4またはCOL8A2である、請求項100に記載の方法。

【請求項 102】

少なくとも1つの標的配列が、配列番号1～1084からなる群から選択される、請求項100に記載の方法。

【請求項 103】

少なくとも1つの標的配列がTCF4遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号1～190から選択される、請求項100に記載の方法。

【請求項 104】

標的配列がCOL8A2遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号191～1084から選択される、請求項100に記載の方法。

【請求項 105】

2つのガイドRNAが使用される、請求項100に記載の方法。

【請求項 106】

少なくとも1つのガイドRNAが、配列番号1～1084から選択される少なくとも1つの標的配列に相補的であるcrRNA配列を含む、請求項100に記載の方法。

【請求項 107】

少なくとも1つのガイドRNAが、配列番号1089～1278からなる群から選択されるガイド配列を含む、請求項100に記載の方法。

【請求項 108】

前記TNRがTCF4遺伝子のイントロン3に位置する、請求項100に記載の方法。

【請求項 109】

少なくとも1つのガイドRNAが、TCF4遺伝子の少なくとも1つの標的配列に相補的であるガイド配列を含む、前記標的配列が配列番号1～190から選択される、請求項100に記載の方法。

【請求項 110】

2つのガイドRNAが使用され、一方のガイドRNAが前記TNRの5'の標的配列に相補的であり、他方のガイドが前記TNRの3'の標的配列に相補的である、請求項109に記載の方法。

【請求項 111】

前記点変異がCOL8A2遺伝子に位置し、標的配列が配列番号1064～1084から選択される、請求項100に記載の方法。

【請求項 112】

10

20

30

40

50

前記 A A V ベクターが C a s タンパク質を含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記 C a s タンパク質が C a s 9 ヌクレアーゼである、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記 T N R が T C F 4 遺伝子のイントロン 3 に位置する、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記 C a s 9 ヌクレアーゼが前記 T N R を切断する、請求項 1 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

2 つの g R N A が使用され、それぞれがガイド配列を含み、一方のガイド配列がヌクレアーゼを T C F 4 遺伝子のイントロン 3 上の第 1 の位置に向け、別のガイド配列がヌクレアーゼを前記 T C F 4 遺伝子のイントロン 3 上の第 2 の位置に向ける、請求項 1 0 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 1 7】

前記ヌクレアーゼが、T C F 4 のイントロン 3 を切断し、第 1 の切断位置と第 2 の切断位置との間の核酸の断片を切除する、請求項 1 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

核酸の前記切除された断片が 1 つ以上の T N R を含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

T N R に関連する疾患または状態を治療するのに適している、請求項 1 0 0 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 0】

T C F 4 遺伝子のイントロン 3 における T N R に関連する疾患または状態を治療するのに適している、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

C O L 8 A 2 遺伝子の点変異に関連する疾患または状態を治療するのに適している、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記ベクターが修復テンプレートをさらに含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記修復テンプレートが、D N A 修復テンプレート、m R N A 修復テンプレート、s i R N A 修復テンプレート、m i R N A 修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される、請求項 1 2 2 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 4】

前記ベクターがプロモーターをさらに含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記プロモーターが、A A V 5、A A V 6、または A A V 8 ベクターと共に使用するために最適化されている、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記プロモーターが組織特異的であり、前記 A A V ベクター、または標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、眼において活性である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 7】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜において活性である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜の内皮において活性である、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記ベクターが、眼への注射を介して前記対象に投与される、請求項 1 0 0 に記載の方法。

50

【請求項 130】

前記ベクターが、眼の前部への注射を介して前記対象に投与される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 131】

ベクターシステムが、角膜実質、角膜輪部、前記角膜の上皮表面、または前記角膜の内皮膜に投与される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 132】

ベクターシステムが前房内（IC）注射を介して前記対象に投与される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 133】

前記 1 つ以上のヌクレオチド配列が、IC 注射後の眼の他の細胞と比較して、角膜内皮細胞で優先的に発現される、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 134】

眼の疾患または状態を治療するのに適している、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 135】

前記眼の前記疾患または状態が前記角膜の疾患または状態である、請求項 134 に記載の方法。

【請求項 136】

前記角膜の前記疾患または状態が、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである、請求項 135 に記載の方法。

【請求項 137】

前記角膜の前記疾患または状態が後部角膜ジストロフィーである、請求項 136 に記載の方法。

【請求項 138】

前記後部角膜ジストロフィーが、フックス内皮角膜ジストロフィー（FEC D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（PPCD；1 型、2 型、および 3 型）、先天性内皮ジストロフィー（1 型および 2 型）、および X 連鎖内皮角膜ジストロフィーからなる群から選択される、請求項 137 に記載の方法。

【請求項 139】

前記角膜ジストロフィーが FEC D である、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 140】

角膜で発現される遺伝子の発現のダウンレギュレートを必要とする対象においてそれを行うための方法であって、

a) AAV ベクターのヌクレオチド配列またはその一部と、

b) 前記角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸と、

c) 前記角膜への送達システムを投与することを含む、前記送達システムを前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 141】

前記遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸が、CRISPR システム核酸配列である、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 142】

前記遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸が CRISPR-Cas システムである、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 143】

前記 CRISPR-Cas システムが CRISPR-Cas 9 システムである、請求項 140 に記載の方法。

【請求項 144】

前記遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸が、アンチセンス RNA、ア

10

20

30

40

50

ンタゴミールRNA、siRNA、shRNAからなる群から選択される、請求項140に記載の方法。

【請求項145】

前記角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも1つのヌクレオチド配列をさらに含む、請求項140に記載の方法。

【請求項146】

前記標的遺伝子がTCF4またはCOL8A2である、請求項140に記載の方法。

【請求項147】

少なくとも1つの標的配列が、配列番号1～1084からなる群から選択される、請求項146に記載の方法。

【請求項148】

少なくとも1つの標的配列がTCF4遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号1～190から選択される、請求項146に記載の方法。

【請求項149】

標的配列がCOL8A2遺伝子に特異的であり、前記標的配列が配列番号191～1084から選択される、請求項146に記載の方法。

【請求項150】

AAVベクター血清型が、AAV5、AAV6、およびAAV8からなる群から選択される、請求項140に記載の方法。

【請求項151】

AAVベクター血清型がAAV5である、請求項140に記載の方法。

【請求項152】

AAVベクター血清型がAAV6である、請求項140に記載の方法。

【請求項153】

AAVベクター血清型がAAV8である、請求項140に記載の方法。

【請求項154】

前記送達システムが修復テンプレートをさらに含む、請求項140に記載の方法。

【請求項155】

前記修復テンプレートが、DNA修復テンプレート、mRNA修復テンプレート、siRNA修復テンプレート、miRNA修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される、請求項154に記載の方法。

【請求項156】

前記送達システムがプロモーターをさらに含む、請求項140に記載の方法。

【請求項157】

前記プロモーターが、AAV5、AAV6、またはAAV8ベクターと共に使用するために最適化されている、請求項156に記載の方法。

【請求項158】

前記プロモーターが組織特異的であり、前記AAVベクター、または標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、眼において活性である、請求項156に記載の方法。

【請求項159】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜において活性である、請求項158に記載の方法。

【請求項160】

前記組織特異的プロモーターが前記角膜の内皮において活性である、請求項159に記載の方法。

【請求項161】

前記標的遺伝子が眼の前部で優先的に発現される、請求項140に記載の方法。

【請求項162】

10

20

30

40

50

少なくとも1つの標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子をダウンレギュレートすることができる前記送達システムおよび／または前記ヌクレオチド配列が、I C注射後の前部で優先的に発現される、請求項140に記載の方法。

【請求項163】

眼の疾患または状態を治療するのに適している、請求項140に記載の方法。

【請求項164】

前記眼の前記疾患または状態が前記角膜の疾患または状態である、請求項163に記載の方法。

【請求項165】

前記角膜の前記疾患または状態が、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

前記角膜の前記疾患または状態が後部角膜ジストロフィーである、請求項165に記載の方法。

【請求項167】

前記後部角膜ジストロフィーが、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（P P C D；1型、2型、および3型）、先天性内皮ジストロフィー（1型および2型）、およびX連鎖内皮角膜ジストロフィーからなる群から選択される、請求項166に記載の方法。

【請求項168】

前記角膜ジストロフィーがF E C Dである、請求項167に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年2月28日に提出された米国仮出願第62／812，017号、および2019年4月10日に提出された同第62／831，838号、および2019年7月26日に提出された同第62／878，865号の優先権を主張し、これらのそれぞれは、その全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I形式で電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2020年6月3日に作成された上記のA S C I Iコピーは、67000-1023__W O__S L. t x tという名称で、サイズは357，652バイトである。

【0003】

本発明は、一般に、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクターを使用して、治療薬を眼、例えば角膜内皮に送達することを対象とする。本発明はまた、A A Vベクターを含む組成物に関する。角膜ジストロフィーは、本発明の方法および組成物で治療することができる。

【背景技術】

【0004】

アデノ随伴ウイルス（A A V）は、小さな複製欠損パルボウイルスである。A A Vの長さは約20～24 nmで、密度は約1.40～1.41 g／c cである。A A Vには、長さが約4.7 kbの一本鎖線形ゲノムD N A分子が含まれている。一本鎖A A VゲノムD N Aは、プラス鎖またはマイナス鎖のいずれかであり得る。A A Vには、2つのオープンリーディングフレーム、R e pとC a pが含まれ、2つの145ベースの逆方向末端反復配列（I T R）が隣接している。A A Vには単一のイントロンが含まれている。ウイルスD N A複製（R e p）、キャプシド形成／パッケージング、および宿主細胞染色体の統合を指示するシス作用性配列は、I T R内に含まれている。3つのA A Vプロモーター、p 5

10

20

30

40

50

、p 1 9、および p 4 0（それらの相対的なマップ位置にちなんで名付けられた）は、r e p および c a p 遺伝子をコードする2つの A A V 内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。p 5 と p 1 9 は r e p プロモーターである。単一の A A V イントロンの選択的スプライシングと組み合わせると、2つの r e p プロモーターにより、r e p 遺伝子から4つの r e p タンパク質（r e p 7 8、r e p 6 8、r e p 5 2、および r e p 4 0）が生成される。r e p タンパク質には、ウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性がある。c a p 遺伝子は p 4 0 プロモーターから発現し、3つのキャプシドタンパク質 V P 1、V P 2、および V P 3 をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセンサス翻訳開始部位は、3つの関連するキャプシドタンパク質の産生に参与している。単一のポリアデニル化部位は、A A V ゲノムのマップ位置 9 5 に位置する。M u z y c z k a は、A A V のライフサイクルと遺伝学をレビューしている（M u z y c z k a , C u r r e n t T o p i c s i n M i c r o b i o l o g y a n d I m m u n o l o g y , 1 5 8 : 9 7 - 1 2 9 (1 9 9 2) ）。

10

【0005】

A A V 感染は培養細胞では非細胞変性性である。ヒトや他の動物の自然感染は無症状で無症候性である（病気を引き起こさない）。A A V は多くの哺乳動物細胞に感染するため、インビボで多くの異なる組織を標的にする可能性がある。分裂している細胞に加えて、A A V は、ゆっくりと分裂している細胞と分裂していない細胞に形質導入し、転写活性のある核エピソーム（すなわち染色体外要素）としてそれらの細胞の寿命の間本質的に存続することができる。A A V プロウイルスゲノムは、プラスミドにクローン化された D N A として感染性があり、組換えゲノムの構築を可能にする。さらに、A A V 複製、ゲノムキャプシド形成、および統合を指示するシグナルはすべて A A V ゲノムの I T R に含まれているため、複製および構造キャプシドタンパク質（r e p - c a p）をコードするゲノムの約 4 . 3 k b の一部またはすべてが、A A V ゲノムの I T R 内に含まれており、プロモーター、目的の D N A、およびポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセットなどの異種 D N A で置き換えることができる。r e p および c a p タンパク質はトランスで提供され得る。A A V は非常に安定した堅牢なウイルスであり、アデノウイルスを不活化するために使用される条件（5 6 ° C ~ 6 5 ° C で数時間）に容易に耐えるため、A A V の低温保存はそれほど重要ではない。また、A A V に感染した細胞は重感染に耐性がない。A A V のこれらのユニークな特性は、例えば遺伝子治療において、細胞または対象に外来 D N A を送達するためのベクターとして有用になる。

20

30

【0006】

角膜ジストロフィーは、角膜に限定された非炎症性の両側性疾患の異種グループの用語である。それらは、病理学の角膜内の解剖学的位置によってグループ化される。ほとんどは角膜の外側に症状がなく、角膜混濁を引き起こし、視力に影響を及ぼす（<https://www.cornealdystrophyfoundation.org/what-is-corneal-dystrophy>を参照）。

【0007】

角膜には、角膜ジストロフィーの影響を受ける3つの主要な領域、角膜上皮、実質、内皮がある。前部角膜ジストロフィーは、角膜上皮とその基底膜、および表在性角膜実質に影響を及ぼす。角膜実質ジストロフィーは角膜実質に影響を及ぼす。後部角膜ジストロフィーは、デスメ膜と角膜内皮に影響を及ぼす。最も一般的な後部角膜ジストロフィーは、フックス角膜内皮ジストロフィーである。

40

【0008】

最近、特定の病的状態または疾患が、転写因子4タンパク質（T C F 4）をコードする T C F 4 遺伝子の変異に関連していることが発見された。T C F 4 遺伝子の変異に関連する疾患には、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D）、後部多形性角膜ジストロフィー（P P C D）、原発性硬化性胆管炎（P S C）、ピット・ホプキンス症候群、遠位 1 8 q 欠失、統合失調症などがある。

【0009】

50

F E C Dは視力の問題を引き起こす状態である。それは目の角膜、特に内皮に影響を及ぼす。角膜は目の前面に位置し、角膜組織には5つの基本的な層がある。上皮は角膜の最外層である。上皮は、眼および角膜の他の層への異物（例えば、粉塵、水、細菌）の通過をブロックするように機能し、涙から酸素と細胞栄養素を吸収するための滑らかな表面を提供し、これらの栄養素を角膜の残りの部分に分配する。上皮細胞は、上皮の基底膜に固定され、組織化される。上皮の基底膜の真下にあるのはボーマン層で、これはコラーゲン繊維で構成された透明な組織のシートである。ボーマン膜の下には実質がある。実質は角膜の厚さの約90%を占め、主に水とコラーゲンで構成されている。薄くて強い組織のシートであるデスメ膜は実質の下にある。デスメ膜はコラーゲン繊維で構成されており、その下にある内皮細胞によって作られている。内皮はデスメ膜の下層である。

10

【0010】

内皮は角膜の非常に薄い最内層であり、角膜をきれいに保つために不可欠である。角膜内皮は、角膜実質と房水との間に障壁を形成する無糸分裂細胞の単層である。角膜内皮細胞は、角膜から液体を送り出して角膜を正しい厚さに維持し、透明度を維持することによって機能する。F E C Dなどの一部の後部角膜ジストロフィーでは、角膜内皮が罹患しており、この進行性疾患の過程で細胞が死滅する。これらの細胞が死ぬと、残りの細胞が膨張して空間を埋め、層は適切に機能する能力を失う。これにより、角膜浮腫と不透明度の増加が生じ、視力が低下する。病気の進行した段階では、失明が結果として起こる可能性がある。F E C Dによる視力喪失は、米国における角膜移植の主な原因である。

【0011】

角膜内皮はこれらの疾患の影響を受けるため、治療薬を送達するようにそれらを標的にすることは、疾患の進行を止めるのに役立つ可能性がある。そのような方法論の1つはアデノ随伴ウイルス(AAV)であり、これは治療薬を送達するためにパッケージ化でき、角膜内皮と接触するために前房内または実質内注射を介して送達できる。タンパク質またはヌクレオチド配列は通常、AAVベクターにパッケージされている。

20

【0012】

遺伝的要因がF E C Dの発生に関連していることが示唆されている。F E C Dに関連することが知られている遺伝子座には、F C D 1からF C D 4、Z E B 1 / T C F 8、S L C 4 A 1 1、L O X H D 1、およびC O L 8 A 2が含まれる。そのような遺伝的要因の1つは、転写因子4(TCF4)遺伝子のトリヌクレオチドリピート(TNR)拡張である。F E C Dの遺伝的素因のほとんどは、TCF4遺伝子の3番目のイントロンのTNRに関連している。50回を超える繰り返しの長さは、一般にF E C Dの臨床診断に関連している(Wieben et al., P L O S O n e, 7:11, e49083(2012))。最近、このTNRの拡大が、影響を受けたTCF4 RNAの凝集、および主要なRNAスプライシング因子の隔離を引き起こすことが示唆されている(Mootha, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 55(1):33-42(2014)、Mootha, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56(3):2003-11(2015)、Vasanth, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56(8):4531-6(2015)、Soliman et al., JAMA Ophthalmol., 133(12):1386-91(2015))。RNAスプライシング因子の隔離は、遺伝子発現の全体的な変化をもたらし、細胞機能の有意な変化と細胞死をもたらす可能性がある(Du et al., J. Biol. Chem., 290:10, 5979-5990(2015))。

30

【0013】

F E C Dに関連する別の遺伝子変異はC O L 8 A 2遺伝子で発生する(Vedana et al., Clinical Ophthalmology, 10, 321-330(2016))。コラーゲンV I I I、またはC O L 8 (C O L 8 A 1とC O L 8 A 2を含む)は、角膜のデスメ膜に規則的に分布している。C O L 8 A 2に変異がある患者の角膜は、調整されていない方法で、異なる量のC O L 8 A 1とC O L 8 A 2の不規則なモザ

40

50

イク沈着を持っていることが示されている。COL8A2の3つの点変異は、変異体COL8ペプチドの細胞内蓄積につながる。これらの点変異は、Gln455Lys、Gln455Val、およびLeu450Trpである。変異体COL8ペプチドの細胞内蓄積は、早期発症型FEC D、および関連する角膜障害PPCD（デスメ膜と角膜の内皮層の変化を特徴とする）を引き起こす可能性がある。

【0014】

AAVベクターは、遺伝子編集治療薬を眼に直接送達するために使用されてきたが、これは一般に、網膜などの眼の後部にのみ示されている。角膜などの眼の前部への遺伝子編集治療薬の送達は、あまりよく研究されておらず、あまり文献に記載されていない。眼の特定の領域および特定の組織または細胞、特に角膜などの前部にのみ治療薬を優先的に送達することができる送達技術を開発する必要性が残っている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】米国仮出願第62／812,017号

【特許文献2】米国仮出願第62／831,838号

【特許文献3】米国仮出願第62／878,865号

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129 (1992)

20

【非特許文献2】Wieben et al., PLOS One, 7:11, e49083 (2012)

【非特許文献3】Mootha, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 55(1):33-42 (2014)

【非特許文献4】Mootha, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56(3):2003-11 (2015)

【非特許文献5】Vasanth, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 56(8):4531-6 (2015)

【非特許文献6】Soliman et al., JAMA Ophthalmol., 133(12):1386-91 (2015)

30

【非特許文献7】Du et al., J. Biol. Chem., 290:10, 5979-5990 (2015)

【非特許文献8】Vedana et al., Clinical Ophthalmology, 10, 321-330 (2016)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明は、角膜ジストロフィー、例えば、FEC Dなどの疾患を治療するために、角膜内皮に治療薬を送達する方法を提供する。本発明の方法は、AAVを利用して、治療薬を眼、特に角膜内皮に直接送達する。特定の実施形態において、AAVは、タンパク質と共に、または、眼の特定の細胞において発現されるように、そのタンパク質をコードするヌクレオチドと共にパッケージ化される。他の実施形態では、AAVは、眼、および眼の特定の領域または細胞において方向付けられた遺伝子編集を誘発するために、CRISPR RNP複合体（すなわち、Casタンパク質との複合体）が詰め込まれている。いくつかの実施形態において、AAVは、Casタンパク質をコードするヌクレオチド配列と複合体を形成したCRISPR gRNAと共にパッケージ化される。本発明はまた、AAVを含む組成物を提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0018】

50

特定の態様では、本発明は、

- a) A A V ベクターのヌクレオチド配列またはその一部と
- b) 角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも 1 つのヌクレオチド配列、角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸、および／または眼で発現されるタンパク質をコードする少なくとも 1 つのヌクレオチド配列またはその一部を含む、核酸編集システムと、を含む、組成物を提供する。

【0019】

別の態様において、本発明は、タンパク質を、それを必要とする対象の眼において発現する方法を提供し、この方法は、

- a) 上記タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む 1 つ以上のアデノ随伴 (A A V) ベクターを提供することと、
- b) 上記 A A V ベクターを眼に投与することを含む。

【0020】

別の態様では、本発明は、角膜で発現される遺伝子を、それを必要とする対象の角膜で修復するための方法を提供し、この方法は、

- a) 角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも 1 つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも 1 つのヌクレオチド配列を含む核酸編集システムと、を含む送達システムを提供することと、
- b) 対象の角膜に送達システムを投与することを含む。

「修復」という用語が使用される場合、それはまた、修復を誘発することを含むことを意味する。

【0021】

さらに別の態様では、本発明は、トリヌクレオチドリピート (T N R) および／または点変異を含む遺伝子の変異体対立遺伝子によって引き起こされる角膜の疾患または状態の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、

- a) 上記遺伝子内のトリヌクレオチドリピート (T N R) の少なくとも一部を切除することであって、

i) T N R、T N R の 5'、T N R の 3'、もしくはそれらの組み合わせ内の配列を標的とする 1 つ以上のガイド RNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む A A V 5、A A V 6、または A A V 8 ベクターを提供することと

i i) 上記ベクターを角膜に投与することを含む、切除すること。および／または

- b) 遺伝子または遺伝子産物の点変異を修正することであって、

i) 遺伝子産物の点変異に関連する遺伝子の配列を標的とする 1 つ以上のガイド RNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む A A V 5、A A V 6、または A A V 8 ベクターを提供することと

i i) 上記ベクターを角膜に投与することを含み、

上記 1 つ以上のヌクレオチド配列は、上記前房内注射後に角膜で優先的に発現される、方法である。

【0022】

別の態様では、本発明は、トリヌクレオチドリピート (T N R) および／または点変異を含む遺伝子の変異体対立遺伝子によって引き起こされる角膜の疾患または状態の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

- a) 上記遺伝子内のトリヌクレオチドリピート (T N R) の少なくとも一部を切除することであって、

i) T N R、T N R の 5'、T N R の 3'、もしくはそれらの組み合わせ内の配列を標的とする 1 つ以上のガイド RNA をコードする 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む A A V 5、A A V 6、もしくは A A V 8 ベクターを提供することと、

i i) 上記ベクターを角膜に投与することと、を含む、切除すること、および／または

- b) 以下を含む遺伝子または遺伝子産物の点変異を修正することであって、
i) 遺伝子産物の点変異に関連する遺伝子の配列を標的とする1つ以上のガイドRNAをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含むAAV5、AAV6、もしくはAAV8ベクターを提供することと、
ii) 上記ベクターを角膜に投与することと、を含む、修正することを含む。

【0023】

別の態様では、本発明は、角膜遺伝子の発現をダウンレギュレートする必要がある対象において上記角膜遺伝子の発現をダウンレギュレートするための方法を提供し、この方法は、対象に、

- a) AAVベクターのヌクレオチド配列またはその一部と、
b) 角膜の疾患または状態に関連する標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子の遺伝子発現をダウンレギュレートすることができる核酸と
c) 角膜に送達システムを投与することを含む、送達システムを投与することを含む。

【0024】

別の態様では、本発明は、対象の角膜の内皮細胞においてタンパク質を優先的に発現する必要がある対象において上記タンパク質を優先的に発現する方法を提供し、

- a) 前記タンパク質をコードするヌクレオチド配列またはその一部を含む1つ以上のアデノ随伴(AAV)ベクターを提供すること、と
b) AAVベクターを角膜に投与することとを含む。

【0025】

本発明のこれらおよび他の目的、利点、および特徴は、以下により完全に説明されるように、組成物および方法の詳細を読むことにより、当業者に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は角膜の層の図である(<https://discovereye.org/treatment-corneal-scratches-and-abrasions/>を参照)。

【図2】図2は、マウスの眼の構造と、眼への前房内および硝子体内注射の図である。

【図3】図3は、AAV5-eGFPの前房内送達後のマウスの眼のインビボ画像を示している。パネルA~Dは、OD眼からの画像を示している(「OD」は、右眼のラテン語であるOculus Dexterを指す)。パネルE~Hは、OS眼からの画像を示している(「OS」は、左目のラテン語であるOculus Sinisterを指す)。パネルAはパネルBの参照を提供する。パネルEはパネルFの参照を提供する。パネルBおよびFは、AAV5-eGFPからの角膜の蛍光を示す画像を示している。パネルCとGは眼底画像を示し、パネルDとHは網膜に蛍光がないことを実証する画像を示す。パネルHの矢印で示されているOS網膜において2つの蛍光ドットが検出される。

【図4】図4は、図3と同じ眼の免疫組織化学を示している。AAV5-eGFPは前房内注射によって送達された。OS眼は角膜フラットマウント(パネルA、パネルBに示されている拡大インサート)と網膜フラットマウント(パネルC、パネルDに示されている拡大インサート)に分けられた。染色は、角膜内皮に局在するeGFPと網膜で染色するいくつかの細胞を示している。OD眼全体を収集し、パネルEに示す断面で処理した。染色では、eGFPが網膜ではなく角膜内皮に局在していることが示されている。拡大されたインサートはパネルFとGに示されている。パネルFは角膜内皮層を示している。パネルGは網膜を示しており、パネルEには見られない正の信号を捕捉するために露光時間を増やす必要があった。(緑=内因性eGFP、赤=eGFPに対する一次抗体を使用した二次染色)。

【図5】図5は、AAV6-eGFPの前房内送達後のマウスの眼のインビボ画像を示している。パネルAはパネルBの参照を提供する。パネルBは、AAV6-eGFPからの角膜の蛍光を示す画像を示している。パネルCは眼底画像を示し、パネルDは網膜の蛍光を示す画像を示している。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、図5と同じマウスの眼の免疫組織化学を示している。染色は、AAV6-eGFPが角膜内皮、実質、および毛様体に存在することを示している（緑＝内因性eGFP、赤＝eGFPに対する一次抗体を使用した二次染色、青＝DAPI染色核）。パネルAの白い長方形は、パネルBに示されている拡大領域を示している。パネルBの左矢印は、角膜実質層が陽性であることを示している。パネルBの右矢印は、正の角膜内皮層を示している。

【図7】図7は、AAV8-eGFPの前房内送達後のマウスの眼のインビボ画像を示している。パネルAはパネルBの参照を提供する。パネルBは、AAV8-eGFPからの角膜の蛍光を示す画像を示している。パネルCは眼底画像を示し、パネルDは網膜の蛍光を示す画像を示している。

10

【図8】図8は、図7と同じマウスの眼の免疫組織化学を示している。染色は、AAV8-eGFPが角膜内皮、実質、および毛様体に存在することを示している（緑＝内因性eGFP、赤＝eGFPに対する一次抗体を使用した二次染色、青＝DAPI染色核）。パネルAの白い長方形は、パネルBに示されている拡大領域を示している。パネルBの左矢印は、角膜実質層が陽性であることを示している。パネルBの右矢印は、正の角膜内皮層を示している。

【図9】図9は、前房内経路で送達されたAAV5-eGFP、AAV6-eGFP、AAV8-eGFPなどのAAV血清型ごとの4匹のマウス（全眼）からのeGFPタンパク質レベルのELISA結果を示している。PBS+0.001%プルロニック酸を投与された2匹のマウスが、試験された各AAV血清型の対照として含まれた。SEMによる平均が示されている。

20

【図10】図10は、マウスの眼にICを送達した後のAAV2-eGFP、AAV5-eGFP、AAV6-eGFP、AAV8-eGFP、およびAAV9-eGFPのインビボ蛍光画像と免疫化学の結果を示す合成図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

前述の一般的な説明および以下の詳細な説明は、例示的および説明的なものにすぎず、特許請求される任意の主題を限定するものではないことを理解されたい。

【0028】

見出しは、組織化する目的でのみ使用され、発明を制限することを意図したものではない。

30

【0029】

別段定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。別段言及されない限り、本明細書の開示全体を通じて参照されるすべての特許、特許出願、公開出願および公開、ウェブサイト、および他の公開資料は、あらゆる目的に対してその全体が参照により組み込まれる。本明細書に記載されているものと類似または同等の任意の方法および材料を本発明の実施または試験の際に使用することができるが、好ましい方法が記載されている。

【0030】

40

角膜ジストロフィーは、角膜に限定された非炎症性の両側性疾患の異種グループのための用語である。それらは、角膜内の病理の解剖学的位置によってグループ化される。ほとんどは角膜の外側に症状がなく、角膜混濁を引き起こし、視力に影響を及ぼす（<https://www.cornealdystrophyfoundation.org/what-is-corneal-dystrophy>を参照）。

【0031】

前部角膜ジストロフィーは、角膜上皮とその基底膜、および表在性角膜実質に影響を及ぼす。角膜実質ジストロフィーは角膜実質に影響を及ぼす。後部角膜ジストロフィーは、デスメ膜と角膜内皮に影響を及ぼす。最も一般的な後部角膜ジストロフィーは、フックス角膜内皮ジストロフィーである。

50

【0032】

角膜には、角膜ジストロフィーの影響を受ける3つの主要な領域、角膜上皮、実質、および内皮がある。AAV5は、IC送達後の角膜内皮を標的とし、後部角膜ジストロフィーの遺伝子治療を送達するために利用できる。AAV6とAAV8はどちらも、IC送達後に角膜実質、内皮、および毛様体を標的にすることができ、角膜実質ジストロフィーおよび角膜後部ジストロフィーの遺伝子治療を送達するために利用できる。一部の前部角膜ジストロフィーは上皮と表在性角膜実質の両方に影響を与えるため、AAV6とAAV8は遺伝子治療を実質に提供する可能性がある。

【0033】

表D1は、角膜ジストロフィーとそれに関連する特定の遺伝子を示している（（Klin
tworth, 2009. Corneal dystrophies. Orphanet
J. Rare Dis., 4, 7. doi:10.1186/1750-1172-4-
7））。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 D1. 角膜ジストロフィーの要約: 遺伝形式、遺伝子座、遺伝子、および角膜ジストロフィー分類のための国際委員会 (IC3D) のカテゴリ。

	遺伝形式	遺伝子座	遺伝子	IC3D カテゴリ*
表在性角膜ジストロフィー				
メースマン角膜ジストロフィー	AD	12q13	KRT3	1
メースマン角膜ジストロフィー	AD	17q12	KRT12	1
ストックホルムホルトジストロフィー	AD	17q12	KRT12	1
顆粒状角膜ジストロフィーIII型 (Reis-Bucklers ジストロフィー)	AD	5q31	TGFB1	1
Thiel-Behnke ジストロフィー	AD	5q31	TGFB1	1
Thiel-Behnke ジストロフィー	AD	10q23-q24	不明	2
ゼラチン状の滴状角膜ジストロフィー (家族性上皮下角膜アミロイドーシス)	AR	1p32	TACSTD2 (MISI)	1
上皮下粘液性角膜ジストロフィー	AD	不明	不明	4
Lisch 上皮ジストロフィー	XR	Xp22.3	不明	2
上皮再発性びらんジストロフィー	AD	不明	不明	3
角膜実質ジストロフィー				
斑状角膜ジストロフィー	AR	16q22	CHST6	1
顆粒状角膜ジストロフィーI型	AD	5q31	TGFB1	1
顆粒状角膜ジストロフィーII型 (アヴェリーノジストロフィー、複合格子-顆粒ジストロフィー)	AD	5q31	TGFB1	1
ラティス角膜ジストロフィーI型およびバリエーション	AD	5q31	TGFB1	1
ラティス角膜ジストロフィーII型	AD	9q34	GSN	1
斑点ジストロフィー	AD	2q35	PIP5K3	1
シュナイダー角膜ジストロフィー	AD	1p34.1-p35	UBIAD1	1
後部無定形角膜ジストロフィー	AD	不明	不明	3
先天性実質ジストロフィー	AD	12q13.2	DCN	1
後部筋ジストロフィー				
フックスジストロフィー (早期発症)	AD	1p34.3	COL8A	1
フックスジストロフィー (遅発性)	AD	13pTel-13q12.13	不明	2
フックスジストロフィー (遅発性)	AD	18q21.2-q21.32	不明	2
フックスジストロフィー (遅発性)	?	20p13-p12	SLC4A11	1

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	遺伝形式	遺伝子座	遺伝子	IC3D カテゴリー*
フックスジストロフィー(遅発性)	?	10p11.2	TCF8	1
後部多形性ジストロフィー1型	AD	20p11.2	不明	2
後部多形性ジストロフィー2型	AD	1p34.3-p32.3	COL8A2#	1
後部多形性ジストロフィー3型	AD	10p11.2	TCF8	1
先天性内皮ジストロフィー1型	AD	20p11.2-q11.2	不明	2
先天性内皮ジストロフィー2型	AR	20p13-p12	SLC4A11	1
X連鎖内皮角膜ジストロフィー	XR	不明	不明	2

*カテゴリ 1: 遺伝子がマッピングおよび同定され、特定の変異が知られている、明確に定義された角膜ジストロフィー。

カテゴリ 2: 1 つ以上の特定の染色体遺伝子座にマッピングされているが、遺伝子(複数可)はまだ特定されていない、明確に定義された角膜ジストロフィー。

カテゴリ 3: 障害がまだ染色体遺伝子座にマッピングされていない、明確に定義された角膜ジストロフィー。

カテゴリ 4: 新たに疑わしいか、または以前に文書化された角膜ジストロフィーは、別個の実体であるという証拠はまだ説得力がないが。

【0034】

表 D 2 は、Moore, C. B. T., Christie, K. A., Marshall, J., & Nesbitt, M. A. (2018) パーソナライズされたゲノム編集ー角膜ジストロフィーの未来。Prog Retin Eye Res, 65, 147-165 . doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.01.004. からのものである。

【表 2 - 1】

表 D2. 関連する遺伝形式、遺伝子座、原因遺伝子など、既知の角膜ジストロフィーのリスト。

		遺伝形式	遺伝子座	既知の遺伝子	影響を受ける遺伝子(複数可)	IC3D カテゴリ
上皮および上皮下ジストロフィー	EBMD	少数の症例、ほとんどが散発的	5q13	ある場合	TGFB1	一部の C1
	ERED	常染色体優性	不明	不明	該当なし	C3
	SMCD	常染色体優性の可能性が高い	不明	不明	不明	C4
	MECD	常染色体優性	12q13 および 17q12	はい	KRT3 および KRT12(ストッカーホルトバリアント)	C1
	LECD	X 染色体優性	Xq22.3	不明	不明	C2
	GDCD	常染色体劣性	1q32	はい	TACSTD2、以前は M1S1	C1
上皮実質ジストロフィー	RBCD	常染色体優性	5q13	はい	TGFB1	C1
	TBCD	常染色体優性	5q13	はい	TGFB1	C1
	LCD1	常染色体優性	5q13	はい	TGFB1	C1
	GCD1	常染色体優性	5q13	はい	TGFB1	C1
	GCD2	常染色体優性	5q13	不明	TGFB1	C1
実質ジストロフィー	MCD	常染色体劣性	16q22	はい	CHST6	C1
	SCD	常染色体優性	1q36	はい	UBIAD1	C1
	CSCD	常染色体優性	12q21.33	はい	DCN	C1
	FCD	常染色体優性	2q34	はい	PIKFYVE、以前は PIP5K3	C1
	PACD	常染色体優性	12q21.33	はい	KERA、LUM、DCN、EPCYC	C1
	CCDF	不明	不明	不明	不明	C4
	PDCD	報告された AD、X 連鎖魚鱗癬で見られる同様の沈着物	X 連鎖魚鱗癬 =Xp22.31	不明	STS	C4

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

		遺伝形式	遺伝子座	既知の遺伝子	影響を受ける遺伝子(複数可)	IC3D カテゴリ
デスメ膜と内皮ジストロフィー	FECD	不明、常染色体優性が報告されている	早期発症 =1q34.3-p32 (FECD1) 遅発性 =13p34-q12.3 (FECD2)、 18q21.2-q21.3 (FECD3)、 20p13-q12 (FECD4)、 5q33.1-q35.2 (FECD5)、 10p11.2 (FECD6)、 9p24.1-p22.1 (FECD7)、 15q25 (FECD8)	ある場合	不明、TCF4、SLC4A11、不明、ZEB1、不明、AGBL1	C2=同定された遺伝子座、C3=既知の遺伝なし
	PPCD	常染色体優性	PPCD 1=20p11.2-q11.2 PPCD 2=1p34.3-p32.3 PPCD 3=10p11.2	不明 はい はい	不明 COL8A2 ZEB1	C2 C1 C1
	CHED	常染色体劣性	20p13	はい	SLC4A11	C1(場合によってはC3)
	XECD	X染色体優性	Xq25	不明	不明	C2
合計:	22	既知=17	既知=18	既知=12 部分的に既知= 4 不明=5		

10

20

30

40

【0035】

例えば、前房内注射によってAAVを直接眼に送達すると、角膜へのウイルス標的化向性をもたらす可能性がある。前房内注射を介してAAV5を送達すると、他の眼球構造ではなく、角膜内皮へのウイルス標的指向性をもたらされる。この標的指向性は、他の眼球構造を温存しながら、影響を受けた構造に治療薬を送達し、標的外効果のリスクを低減する可能性がある。AAV6またはAAV8の前房内送達も、角膜内皮への標的化を示している。ただし、AAV6とAAV8はどちらも、遍在するCAGプロモーターを使用して遺伝子を送達すると、網膜だけでなく、他の角膜および前部構造にも向性を示す。

【0036】

50

A A Vは、2つのオープンリーディングフレームであるR e pとC a pで構成される小さなウイルスであり、2つの1 4 5塩基の逆方向末端反復配列（I T R）が隣接している。遺伝子治療に使用される場合、R e pおよびC a pのオープンリーディングフレームが除去され、目的の遺伝子の転写を駆動するプロモーターと共に、目的の遺伝子がI T Rの間に挿入される。

【0037】

C R I S P Rヌクレオチド（例えば、g R N Aおよび／またはC a sタンパク質をコードするヌクレオチド）をI T R間でパッケージ化して、治療薬の標的化送達用のウイルスベクターを作成できる。いくつかの実施形態において、C R I S P Rヌクレオチドg R N Aは、C a sタンパク質（例えば、C a s 9ヌクレアーゼ）と共にパッケージされて、リボヌクレオタンパク質（R N P）複合体を形成する。ただし、A A Vは、他のタンパク質をコードするヌクレオチドと一緒にパッケージ化することもできる。A A Vは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染する可能性があり、病原性の欠如に関連しているため、好ましいウイルスベクターである。

10

【0038】

したがって、A A Vベクターを使用して角膜の特定の層を優先的に標的にすることができる。例えば、A A V 5は特に角膜内皮を標的とする。A A Vベクターの特異性は、A A Vベクターを介して送達される治療薬のオフターゲット効果のリスクを低減する。

【0039】

特定の実施形態において、A A Vベクターは、標的遺伝子上の少なくとも1つの標的配列に相補的である1つ以上のヌクレオチド配列を含み得る。

20

【0040】

いくつかの実施形態において、A A Vベクターは、1つ以上のヌクレオチド酸編集システムを含むことができる。ヌクレオチド編集システムには、C R I S P Rシステム、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンスR N A、またはアンタゴミールR N Aが含まれるが、これらに限定されない。

【0041】

特定の実施形態において、A A Vベクターは、1つ以上のヌクレオチド編集システムを眼に直接送達することによって、眼、好ましくは角膜または他の影響を受けた前部構造における標的遺伝子編集または治療に使用することができる。

30

【0042】

特定の実施形態において、A A Vベクターは、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D）などの角膜ジストロフィーに関連する遺伝子を標的とするC R I S P R複合体を送達することにより、角膜における標的遺伝子治療に使用することができる。F E C Dは、転写因子4（T C F 4）遺伝子のトリヌクレオチドリピート（T N R）の拡大に関連している。F E C Dの遺伝的素因のほとんどは、T C F 4遺伝子の3番目のイントロンのT N Rに関連している。F E C Dは、目の角膜、特に内皮に影響を与える状態である。角膜ジストロフィーは、C O L 8 A遺伝子の変異にも関連している。C O L 8 A遺伝子の変異は、遺伝子産物にG l n 4 5 5 L y s、G l n 4 5 5 V a l、またはL e u 4 5 0 T r p変異をもたらす。

40

【0043】

C R I S P R複合体（g R N AとC a sタンパク質、またはC a sタンパク質をコードするヌクレオチド）を角膜内皮に送達することにより、眼の他の部分のT C F 4遺伝子に影響を与えることなく、T N Rまたはその一部を角膜内皮のT C F 4遺伝子から切除することができる。

【0044】

特定の実施形態において、C R I S P R複合体は、1つ以上のA A Vベクターにパッケージ化される。C R I S P R複合体は、T C F 4遺伝子のT N R、またはC O L 8 A 2遺伝子の変異体対立遺伝子のいずれかを標的とする可能性がある。

【0045】

50

特定の実施形態において、AAVベクターは、それ自体によって送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウィルスカプシドに封入され得る。

【0046】

定義

本出願では、別段明記されない限り、単数形の使用は、複数形を含む。本明細書で 사용되는場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が別段明確に示さない限り、複数形も含むよう意図される。

【0047】

本出願では、「または」の使用は、別段明記されない限り、「および／または」を意味する。

10

【0048】

本明細書で 사용되는場合、用語「含む (comprises)」および／または「含む (comprising)」は、明記された特徴、整数、ステップ、操作、要素、および／または構成成分の存在を特定するが、1つ以上の他の特徴、整数、ステップ、操作、要素、構成成分、および／もしくはそれらの群の存在または追加を排除しない。さらに、用語「含む」、「有する (having)」、「有する (has)」、「有する (with)」、「構成された (composed)」、「構成された (comprised)」、またはそれらの変形が、詳細な説明または特許請求の範囲で使用される範囲で、かかる用語は、用語「含む (comprising)」と同様の様式で包括的であることが意図される。

20

【0049】

本明細書で 사용되는場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表され得る。「約」は、正確な量も含むことが意図される。したがって、「約5パーセント」は、「約5パーセント」および「5パーセント」もまた意味する。「約」は、意図された用途または目的についての典型的な実験誤差の範囲内を意味する。

【0050】

本明細書で 사용되는場合、「治療」は、疾患または状態の治療薬の送達、投与、または適用を指す。治療には、疾患の治療、疾患の抑制、疾患の発症の遅延または停止、疾患の1つ以上の症状の改善、または疾患の1つ以上の症状の再発の予防が含まれる場合がある。

30

【0051】

本明細書で 사용되는場合、「FEC D」は、フックス内皮角膜ジストロフィーを指す。FEC Dには、この状態の患者と、症状はないがFEC Dの遺伝的素因がある個人が含まれる。

【0052】

本明細書で 사용되는場合、「AAV」は、アデノ随伴ウイルスを指す。AAVは、二十面体であり、長さが約20~24 nm、密度が約1.40-1.41 g/ccで、長さが約4.7 kbの一本鎖線状ゲノムDNA分子を含むエンベロープを持たないウイルスである。一本鎖AAVゲノムDNAは、プラス鎖またはマイナス鎖のいずれかである。特定の実施形態において、「AAV」または「AAVベクター」という用語は、例えば、CRISPR複合体などの治療薬が、AAVゲノムの逆方向末端反復配列 (ITR) 間のRepおよびCapオープンリーディングフレームを置き換えるように改変されたAAVを指す。

40

【0053】

本明細書で 사용되는場合、「AAV血清型」は、血清学的またはDNA配列決定法によって識別可能であり、その抗原性によって区別することができるAAVの下位の区分を意味する。

【0054】

本明細書で 사용되는場合、「ベクター」は、単離された核酸を含み、単離された核酸を

50

細胞の内部に送達するために使用することができる物質の組成物である。ベクターには、線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド、およびウイルスが含まれるが、これらに限定されない。「ベクター」という用語は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。「ベクター」はまた、例えば、ポリリジン化合物リポソーム、脂質ナノ粒子、非脂質ナノ粒子などの、細胞への核酸の移動を容易にする非プラスミドおよび非ウイルス化合物を含み得る。ウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、ベクターはAAVベクターである。

【0055】

本明細書で使用される場合、「RNA」は、1つ以上のリボヌクレオチド残基を含む分子を指す。「リボヌクレオチド」は、ベクターD-リボフラノース部分の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドである。「RNA」という用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、単離されたRNA（例えば、部分的に精製されたRNA）、本質的に純粋なRNA、合成RNA、および組換えにより産生されたRNAを含む。「RNA」という用語はまた、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドなどの1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または変更によって天然に存在するRNAとは異なる修飾RNAを指す。

【0056】

本明細書で使用される場合、「阻害性RNA」は、標的核酸のレベルまたは活性の低下を媒介する標的核酸に相補的な配列を含む核酸分子を意味する。阻害性RNAには、干渉RNA（iRNA）、ショートヘアピンRNA（shRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、リボザイム、アンタゴミア、アンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

本明細書で使用される場合、「shRNA」は、アンチセンス領域、ループ部分、およびセンス領域を含むRNA分子を指し、センス領域は、アンチセンス領域と塩基対を形成して二重鎖ステムを形成する相補的なヌクレオチドを有する。転写後プロセッシングに続いて、shRNAはRNase IIIファミリーのメンバーである酵素Dicerによって媒介される切断によってsiRNAに変換される。

【0058】

本明細書で使用される場合、「siRNA」は、配列特異的な方法でRNA干渉を媒介することによって遺伝子発現を阻害またはダウンレギュレートすることができる任意の低分子RNA分子を指す。

【0059】

本明細書で使用される場合、「アンチセンスRNA」または「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、その配列がタンパク質をコードするmRNAに相補的である短い合成核酸片である。アンチセンスRNAはmRNAに結合し、転写をブロックする。

【0060】

本明細書で使用される場合、「アンタゴミール」または「アンタゴミールRNA」は、特定のマイクロRNA（miRNA）標的に相補的であり、場合により切断部位でのミスペアリングまたは切断を阻害するための1つ以上の塩基修飾のいずれかを伴う小さな合成RNAを指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、「マイクロRNA」または「miRNA」は、遺伝子発現を調節する、長さが約21～23ヌクレオチドの一本鎖RNA分子を指す。miRNA分子は1つ以上のmRNAに部分的に相補的であり、それらの主な機能は遺伝子発現をダウンレギュレートすることである。

【0062】

本明細書で使用される場合、「TNR」は、トリヌクレオチドリピート（すなわち、3つ

10

20

30

40

50

の塩基対の複数のリピート)を指す。「TNR拡張」という用語は、通常よりも多いTNRの数を指す。例えば、TCF4のイントロン3の約50以上のTNRは、TNR拡張と見なされる。

【0063】

本明細書で使用される場合、「CRISPR」は、CRISPR（クラスター化された規則的に間隔を空けた短いパリンドローム反復）配列として知られる細菌適応免疫システムを意味する。

【0064】

本明細書で使用される場合、「ガイドRNA」および「gRNA」は交換可能に使用され、標的DNA配列に向けられたRNA配列を指す。gRNAには、CRISPR RNA (crRNA) とトランス活性化crRNA (trRNAまたはtracrRNA) が含まれている。crRNAとtrRNAは、シングルガイドRNA (sgRNA) と呼ばれる単一のRNA分子に結合している場合がある。あるいは、crRNAとtrRNAは別々のRNA分子で分離され、デュアルガイドRNA (dgRNA) を形成する場合がある。いくつかの実施形態では、gRNAは化学的に修飾されており、1つ以上の修飾されたヌクレオシドまたはヌクレオチドを含む。ヌクレオシドおよびヌクレオチドの修飾には、i) ホスホジエステル骨格中の非結合リン酸酸素の一方もしくは両方および／または結合リン酸酸素の1つ以上の変化、例えば置換、ii) 例えば、リボース糖上の2'-ヒドロキシルなどのリボース糖の成分の修飾、例えば置換、iii) リン酸部分の「脱ホスホ」リンカーによる完全な置き換え、iv) 非標準的な核酸塩基を含む、天然に存在する核酸塩基の修飾または置換、v) リボース-リン酸骨格の置換または修飾、vi) オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション、およびvii) 糖の修飾または置換の1つ以上が含まれ得る。

【0065】

本明細書で使用される場合、「ガイド配列」は、標的配列に相補的であるcrRNAまたはtrRNA内の約20塩基対の配列を指す。ガイド配列は、ヌクレアーゼによる切断のために、gRNAを標的配列に向ける。

【0066】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、対象のゲノムDNA内の、gRNAが標的配列の切断のためにヌクレアーゼを方向付ける核酸の配列を指す。例えば、Casタンパク質はgRNAによって標的配列に向けられ、そこでgRNAは標的配列とハイブリダイズし、ヌクレアーゼは標的配列を切断する。標的配列には、DNAの+鎖と-鎖の両方の鎖（すなわち、その配列、および配列の逆相補体）が含まれる。いくつかの実施形態において、ガイド配列が標的配列の逆相補体である場合、ガイド配列は、標的配列の最初の20ヌクレオチドと同一であり得る。本明細書で使用される場合、「標的配列」または「標的部位」はまた、結合が起こるのに十分な条件下で結合分子が特異的に結合し得る核酸の部分を定義するゲノム核酸配列を指す。

【0067】

本明細書で使用される場合、「CRISPR複合体」という用語は、Casタンパク質をコードするgRNAとエンドヌクレオチドの組み合わせ（gRNA: Casエンドヌクレオチド）、またはgRNAとCasタンパク質の組み合わせ（gRNA: Casタンパク質）を指す。本明細書で使用される場合、「リボヌクレオタンパク質」（RNP）は、gRNA: Casタンパク質複合体を指す。本発明のCRISPR複合体は、TNR内、またはTCF4遺伝子のTNR（5'または3'）のいずれかに隣接する標的配列に向けられ、かつこの標的配列を切断し得る。CRISPR複合体はまた、COL8A遺伝子の標的配列を切断するように方向付けられ得る。本明細書で使用される場合、「プロトスペーサー隣接モチーフ」または「PAM」は、標的ヌクレオチド配列に隣接しなければならないヌクレオチド配列を指す。必要なPAMは、使用する特定のCRISPRシステムによって異なる。例えば、Streptococcus pyogenesに由来するCRIS

10

20

30

40

50

PR/Casシステムでは、最適な切断のために、標的DNAが5'-NGG PAM (「N」は任意の核酸塩基とそれに続く2つのグアニン核酸塩基)の直前にある必要がある。Streptococcus pyogenes Cas9も5'-NAG PAMを認識するが、これらのPAM部位では効率が低下しているようである。他のCas9オルソログ (Staphylococcus aureus由来など)には、異なるPAM配列が必要である。

【0068】

本明細書で使用される場合、「インデル」は、DNAの核酸の二本鎖切断 (DSB)の部位で挿入または欠失のいずれかを受ける多数のヌクレオチドからなる挿入／欠失変異を意味する。

【0069】

本明細書で使用される場合、「切除フラグメント」または「切除フラグメント」は、2つ以上のgRNAがCas mRNAまたはCasタンパク質と一緒に使用されるときに起こり得る連続した数のヌクレオチド (TNRなど)の欠失を指す。

【0070】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するために必要とされる、細胞の合成機構によって認識されるか、または導入された合成機構によって認識されるDNA配列を意味する。好ましくは、AAVベクター、好ましくはAAV5、AAV6、および／またはAAV8に対して作動可能なプロモーター、ならびに好ましくは眼に特異的、より好ましくは角膜に特異的、最も好ましくは角膜の内皮に特異的な組織特異的プロモーターである。AAVプロモーターには、例えば、AAVp5プロモーターが挙げられる。プロモーターには、CAG、SYN1、CMV、NSE、CBA、PDGF、SV40、RSV、LTR、SV40、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、ベータアクチンプロモーター、PGK、EF1alpha、GRK、MT、MMTV、TY、RU486、RHO、RHOK、CBA、キメラCMV-CBA、MLP、RSV、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、その機能的フラグメントなどが挙げられるがこれらに限定されない。異種DNAがパッケージされたAAVでは、通常は異種核酸に関連するプロモーターを使用することができ、または通常はAAVベクターに関連するプロモーター、または通常はどちらにも関連しないプロモーターを使用することができる。

【0071】

本明細書で使用される場合、「構成的プロモーター」は、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結されると、細胞のほとんどまたはすべての生理学的条件下で遺伝子産物を細胞内で産生させるヌクレオチド配列である。構成的プロモーターの例には、サイトメガロウイルス前初期プロモーター (CMV)、シミアンウイルス (SV40)プロモーター、アデノウイルスメジャー後期 (MLP)プロモーター、ルース肉腫ウイルス (RSV)プロモーター、伸長因子-アルファ (EF1a)プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能的断片、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0072】

本明細書で使用される場合、「誘導性プロモーター」は、遺伝子産物をコードまたは特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結された場合、プロモーターに対応するインデューサーが細胞内に存在する場合にのみ、実質的に細胞内で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。誘導性プロモーターの例には、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導性のものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、プロモーターは、角膜、例えば角膜内皮における発現に特異的なプロモーターなどの組織特異的であり得る。

【0073】

本明細書で使用される場合、「組織特異的プロモーター」は、遺伝子産物をコードまたは

10

20

30

40

50

特定するポリヌクレオチドと作動可能に連結された場合、細胞がプロモーターに対応する組織タイプの細胞である場合にのみ、実質的に細胞内で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。組織特異的プロモーターには、CMV、CBA、RHO、およびRHO Kが含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

本明細書で使用される場合、「プロモーター／調節配列」は、プロモーター／調節配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味する。この配列は、コアプロモーター配列であり得るか、またはそれはまた、遺伝子産物の発現に必要とされるエンハンサー配列および他の調節エレメントを含み得る。

【0075】

本明細書で使用される場合、「転写制御下」または「作動可能に連結された」とは、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するためにポリヌクレオチドに対して正しい位置および配向にあることを意味する。これらには、プロモーター、3'UTR、または5'UTRが含まれる。プロモーターは、RNAポリメラーゼIII (Pol III) によって認識され得、これは、U6およびH1 Pol IIIプロモーターなどであるがこれらに限定されない。Pol IIIプロモーターは、例えば、マウスまたはヒトであり得る。

【0076】

本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」または「核酸編集」は、標的遺伝子の核酸配列の改変を指す。

【0077】

本明細書で使用される場合、「核酸編集システム」または「遺伝子編集システム」は、遺伝子編集または核酸編集を実行するために使用することができる方法を指す。核酸編集システムおよび遺伝子編集システムには、CRISPRシステムおよび干渉RNAが含まれる。

【0078】

本明細書で使用される場合、「送達システム」は、標的細胞に核酸を送達するために使用される材料を指す。そのような材料は、AAVベクターなどのウイルスベクターおよび薬学的に許容される成分を含み得る。

【0079】

本明細書で使用される場合、「調節」または「修飾」は、例えば、遺伝子またはタンパク質の発現または機能の減少または阻害、ならびに例えば、遺伝子またはタンパク質の発現または機能の増加を含む。本明細書で使用される場合、「調節」または「修飾」はまた、遺伝子の変異部分（複数可）の置換または変異遺伝子の野生型バージョンでの置換を含む、遺伝子機能の完全な回復を含む。

【0080】

本明細書で使用される場合、「ダウンレギュレート」または「ダウンレギュレーション」は、標的ヌクレオチド配列の発現または転写の減少を意味する。ダウンレギュレーションは、標的ヌクレオチド配列の発現または転写の部分的または一時的な減少である可能性がある。ダウンレギュレーションは、標的ヌクレオチド配列の発現または転写の完全な排除である可能性がある。

【0081】

本明細書で使用される場合、「ノックダウン」は、標的ヌクレオチド配列の発現または転写の部分的または一時的な減少を指す。これは、標的配列に結合する相補的ヌクレオチド配列を投与することによって達成することができる。ノックダウンは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAなどによって誘発することができる。

【0082】

本明細書で使用される場合、「ノックアウト」は、標的ヌクレオチド配列の発現または転写の完全な排除を指す。ノックアウトは、例えば、CRISPRシステムを使用して、標的遺伝子から標的ヌクレオチド配列を切断することによって誘発され得る。

10

20

30

40

50

【0083】

本明細書で使用される場合、非相同末端結合（NHEJ）は、標的ヌクレオチド配列の切断後の切断末端の再連結であるDNA修復メカニズムである。

【0084】

本明細書で使用される場合、「相同修復／相同指向修復（HR／HDR）」は、DNAテンプレートが二本鎖切断の正確な修復に必要な相同性を提供するために使用される相同組換えのプロセスであるDNA修復を指す。修復は、所望の配列の挿入、または標的配列の改変からなり得る。

【0085】

本明細書で使用される場合、「修復テンプレート」は、HR／HDRで使用されるDNAテンプレートを指す。

【0086】

本明細書で使用される場合、「対象」は生物を意味する。好ましくは、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類などの哺乳動物、またはイヌ、ネコ、ウシ、ブタなどのコンパニオンアニマルである。

【0087】

遺伝子発現の調節

遺伝子発現は、ヌクレオチド編集システムを含む組成物を、それを必要とする対象に投与することによって調節することができる。

【0088】

一実施形態では、標的遺伝子の発現を調節することは、対象に組成物を投与することを含み、組成物は、角膜ジストロフィーに関連する標的遺伝子上の少なくとも1つの対立遺伝子に相補的である少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む核酸編集システムを含む。特定の実施形態において、標的遺伝子上の少なくとも1つの対立遺伝子に相補的である少なくとも1つのヌクレオチド配列は、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、またはアンタゴミールRNAから選択される。

【0089】

組成物の投与

特定の実施形態では、組成物はそれ自体で投与される。

【0090】

好ましい実施形態では、組成物は、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、またはAAVベクターをコードするヌクレオチド配列またはその一部を含む。

【0091】

AAV

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、小さな複製欠損パルボウイルスである。AAVの長さは約20～24nmで、密度は約1.40～1.41g/ccである。AAVには、長さが約4.7kbの一本鎖線形ゲノムDNA分子が含まれている。一本鎖AAVゲノムDNAは、プラス鎖またはマイナス鎖のいずれかである。AAVには、2つのオープンリーディングフレーム、RepとCapが含まれ、2つの145ベースの逆方向末端反復配列（ITR）が隣接している。AAVには単一のイントロンが含まれている。ウイルスDNA複製（Rep）、キャプシド形成／パッケージング、および宿主細胞染色体の統合を指示するシス作用性配列は、ITR内に含まれている。3つのAAVプロモーター、p5、p19、およびp40（それらの相対的なマップ位置にちなんで名付けられた）は、repおよびcap遺伝子をコードする2つのAAV内部オープンリーディングフレームの発現を駆動する。p5とp19はrepプロモーターである。単一のAAVイントロンの選択的スプライシングと組み合わせると、2つのrepプロモーターにより、rep遺伝子から4つのrepタンパク質（rep78、rep68、rep52、およびrep40）が生成される。repタンパク質には、ウイルスゲノムの複製に関与する複数の酵素特性がある。cap遺伝子はp40プロモーターから発現し、3つのキャプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。選択的スプライシングおよび非コンセ

10

20

30

40

50

ンサス翻訳開始部位は、3つの関連するキャプシドタンパク質の産生に参与している。単一のポリアデニル化部位は、AAVゲノムのマップ位置95に位置する。Muzyczkaは、AAVのライフサイクルと遺伝学をレビューしている(Muzyczka, Current Topics in Microbiology and Immunology, 158:97-129 (1992))。

【0092】

AAV感染は培養細胞では非細胞変性性である。ヒトや他の動物の自然感染は無症状で無症候性である(疾患を引き起こさない)。AAVは多くの哺乳動物細胞に感染するため、インビボで多くの異なる組織を標的にする可能性がある。分裂している細胞に加えて、AAVはゆっくりと分裂している細胞と分裂していない細胞に形質導入し、転写活性のある核エピソーム(すなわち染色体外要素)としてそれらの細胞の寿命の間本質的に存続することができる。AAVプロウイルスゲノムはプラスミドにクローン化されたDNAとして感染性があり、組換えゲノムの構築を可能にする。さらに、AAV複製、ゲノムキャプシド形成、および統合を指示するシグナルはすべてAAVゲノムのITRに含まれているため、複製および構造キャプシドタンパク質(rep-cap)をコードするゲノムの約4.3 kbの一部またはすべてが、AAVゲノムのITR内に含まれており、プロモーター、目的のDNA、およびポリアデニル化シグナルを含む遺伝子カセットなどの異種DNAで置き換えることができる。repおよびcapタンパク質はトランスで提供され得る。

【0093】

いくつかのAAV血清型が同定されており、それらの向性(感染する細胞のタイプ)は異なっている。血清型AAV1は、CNS、心臓、網膜色素上皮(RPE)、および骨格筋の組織に対して向性を示す。血清型AAV2は、CNS、腎臓、光受容細胞、およびRPEの組織に対して向性を示す。血清型AAV3は、主に心臓と肝臓に向性を示す。血清型AAV4は、CNS、肺、およびRPEの組織に対して向性を示す。血清型AAV5は、CNS、肺、光受容細胞、およびRPEの組織に対して向性を示す。血清型AAV6は、肺および骨格筋の組織に対して向性を示す。血清型AAV7は、肝臓および骨格筋の組織に対して向性を示す。血清型AAV8は、CNS、心臓、肝臓、膵臓、光受容細胞、RPE、および骨格筋の組織に対して向性を示す。血清型AAV9は、CNS、心臓、肝臓、肺、および骨格筋組織に対して向性を示す。AAVウイルスの向性は、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の変動性に関連している可能性があり、これは、さまざまなタイプの細胞に存在するさまざまな機能的受容体に結合する可能性がある。

【0094】

異種DNAカセットに含まれるプロモーターによっては、眼の特定の組織を標的にすることが可能な場合がある。キャプシドタンパク質を修飾すると、特定の組織または細胞の特定の感染性も可能になる場合がある。一実施形態では、Anc80またはAnc80L65キャプシドタンパク質を含むAAVは、眼の特定の組織に直接治療薬を送達するために使用される。いくつかの実施形態において、AAVウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6(例えば、USPG Pub. 2012/0164106に記載されるような、野生型AAV6キャプシド、またはShH10などのバリエーションAAV6キャプシド)、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9(例えば、野生型AAV9キャプシド、またはUSPG Pub. 2013/0323226に記載されている改変AAV9キャプシド)、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、チロシンキャプシド変異体、ヘパリン結合キャプシド変異体、AAV2R471Aキャプシド、AAVAAV2/2-7m8キャプシド、AAVDJキャプシド(例えば、AAV-DJ/8キャプシド、AAV-DJ/9キャプシド、またはUSPG Pub. 2012/0066783に記載されている任意の他のキャプシド)、AAV2N587Aキャプシド、AAV2E548Aキャプシド、AAV2N708Aキャプシド、AAVV708Kキャプシド、ヤギAAVキャプシド、AAV1/AAV2キメラキャプシド、ウシAAVキャプシド、マウスAAVキャプシド、rAAV2/HBoV1キャプシド、または米国特許第8,283,151号または国際公開

第WO／2003／042397号に記載されているAAVキャプシドを含む。いくつかの実施形態において、AAVウイルス粒子は、AAV2のVP1に基づいて番号付けされた、位置R484、R487、K527、K532、R585またはR588のうちの1つ以上でアミノ酸置換を含むAAVキャプシドを含む。さらなる実施形態において、AAV粒子は、クラスA～FからのAAV血清型のキャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、rAAVウイルス粒子は、AAV血清型2キャプシドを含む。さらなる実施形態において、AAV血清型2キャプシドは、AAV2 VP1に対して番号付けされた、R471Aアミノ酸置換を含むAAV2キャプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAVDJ、ヤギAAV、ウシAAV、またはマウスAAV血清型逆方向末端反復配列（ITR）を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、AAV血清型2 ITRを含む。いくつかの実施形態において、AAVウイルス粒子は、同じAAV血清型に由来する1つ以上のITRおよびキャプシドを含む。他の実施形態では、AAVウイルス粒子は、rAAVウイルス粒子のキャプシドとは異なるAAV血清型に由来する1つ以上のITRを含む。いくつかの実施形態において、rAAVウイルス粒子は、AAV2キャプシドを含み、ベクターは、AAV2 ITRを含む。さらなる実施形態において、AAV2キャプシドは、AAV2 VP1に対して番号付けされた、R471Aアミノ酸置換を含むAAV2キャプシドタンパク質を含む（米国特許公開第2017／0304465号を参照のこと）。

10

20

【0095】

最近、AAV5ベクターにヒトロドプシンキナーゼ（hGRK1）プロモーターを含めると、霊長類の網膜で桿体および錐体に特異的な発現が生じることが示された（Boye, et al., Human Gene Therapy, 23:1101-1115 (October 2012) (DOI:10.1089/hum.2012.125))。

【0096】

最近、キャプシドタンパク質が変化したAAVビリオンがより大きな組織特異的感染力を与える可能性があることも示された。例えば、バリエーションキャプシドタンパク質を含むAAV6は、野生型AAVキャプシドタンパク質（米国特許第8,663,624号）と比較して網膜細胞の感染力の増加を示す。AAV2のVP1のアミノ酸570および611に対応する2つの隣接するアミノ酸間のペプチド挿入、または別のAAV血清型のキャプシドタンパク質の対応する位置を含むバリエーションキャプシドタンパク質は、野生型AAVと比較して、網膜細胞の感染性の増加をもたらす（米国特許第9,193,956号）。

30

【0097】

角膜におけるタンパク質の発現

角膜で特定のタンパク質を発現させるために、所望のタンパク質をコードするエンドヌクレオチドのいずれかがパッケージされたAAVベクター、または所望のタンパク質がパッケージされたAAVベクターを、眼に直接送達または投与することができる。タンパク質には、例えば、CRISPR関連（Cas）タンパク質、またはマーカータンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFPまたはeGFP））が含まれ得る。

40

【0098】

特定の実施形態において、AAVベクターは、粒子または脂質管に封入されることなく送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスキャプシドに封入され得る。

【0099】

いくつかの実施形態において、組成物および／またはAAVベクターは、眼に直接送達され得る。組成物および／またはAAVベクターは、前眼房、後眼房、角膜、または目の硝子体房に投与することができる。好ましい実施形態では、AAVベクターは、角膜と接触している前房の房水に直接投与される。本発明で定義されるように、遺伝子発現を調節する目的で、デュアルAAVベクターシステムなどの1つより多くのAAVベクターを使用

50

することができる。

【0100】

上で説明したように、いくつかのAAV血清型があり、それぞれが特定の種類の組織に対して向性を示す。使用されるAAV血清型は特に限定されないが、AAV5、AAV6、およびAAV8血清型は、眼の角膜および前部組織を標的とするための好ましいAAVベクターである。

【0101】

本発明における異なるAAV血清型のウイルス向性を試験するために、いくつかの血清型が、緑色蛍光タンパク質（GFPまたはeGFP）をコードするヌクレオチド配列と共にパッケージされた。これらのAAV-eGFP複合体は前房内で眼に送達された。GFPの蛍光はインビボで測定でき、AAV-GFPの局在を示している。GFPの局在は、眼の切片に対して免疫組織化学を行うことによっても評価できる。免疫組織化学的染色によって示されるように、AAV5のウイルス向性は角膜内皮に局在していた。AAV6のウイルス指向性は、角膜内皮、実質と内皮、および毛様体に局在し、網膜細胞を標的とするものもあった。AAV8のウイルス指向性は、角膜内皮と実質、および毛様体に局在し、網膜細胞を標的とするものもあった。AAV2およびAAV9のウイルス向性は、IC投与後、眼の後部と前部の両方に局在し、前部よりも後部でより多く発現していた。

【0102】

結果は、AAV5、AAV6、およびAAV8が角膜組織に対して選択的な向性を示すことを示している。角膜内皮への選択的標的化が望まれる場合、AAV5の使用が好ましい。組織選択性が低い他のAAV血清型（例えば、AAV2）を使用すると、望ましくないオフターゲット効果が生じる可能性がある。

【0103】

特定の実施形態において、AAVベクターは、それ自体によって送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスキャプシドに封入され得る。

【0104】

いくつかの実施形態において、AAVベクターは、眼に直接送達され得る。AAVベクターは、前眼房、後眼房、角膜、または眼の硝子体房に投与することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、角膜実質、角膜輪部、角膜の上皮表面、または角膜の内皮膜に投与することができる。好ましい実施形態では、AAVベクターは、角膜内皮と直接接触している前房の房水に直接投与される。

【0105】

CRISPR複合体を使用した遺伝子標的化

特定の実施形態において、CRISPR複合体は、遺伝子のDNAの特定のヌクレオチド配列を改変するために使用される。遺伝子のDNAの特定のヌクレオチド配列は「標的配列」である。

【0106】

CRISPR複合体は、Casタンパク質をコードするgRNAとエンドヌクレオチドの組み合わせ（gRNA：Casエンドヌクレオチド）、またはgRNAとCasタンパク質の組み合わせ（gRNA：Casタンパク質）である。

【0107】

gRNAは、標的DNA配列に向けられたRNA配列を含む。gRNAには、CRISPR RNA（crRNA）とトランス活性化crRNA（trRNAまたはtracrRNA）が含まれている。crRNAとtrRNAは、シングルガイドRNA（sgRNA）と呼ばれる単一のRNA分子に結合している場合がある。あるいは、crRNAとtrRNAは別々のRNA分子で分離され、デュアルガイドRNA（dgRNA）を形成する場合がある。gRNAは、DNAの+鎖または-鎖のいずれかを標的にすることができる。

【0108】

。

10

20

30

40

50

gRNAは、Casコンポーネント（つまり、Casタンパク質をコードするエンドヌクレオチドまたはCasタンパク質）を標的配列に導く。gRNAは、標的配列、または標的配列の逆相補体に相補的であり、それらとハイブリダイズする。いくつかの実施形態において、gRNA配列は、標的配列と100%相補的または同一である。好ましくは、gRNAのガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも約50%以上である。例えば、相補性または同一性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。

【0109】

いくつかの実施形態では、gRNAは化学的に修飾されており、1つ以上の修飾されたヌクレオチドまたはヌクレオチドを含む。ヌクレオチドおよびヌクレオチドの修飾には、i) ホスホジエステル骨格（例えば、ホスホロチオエートまたはボラノスホスフェート結合）における非結合性リン酸酸素の一方または両方の、および／または結合性リン酸酸素の1つ以上の変更、例えば、置換、ii) 例えば、2'-O-メチルおよび／または2'-フルオロおよび／または4-チオ修飾などのリボース糖の構成要素の変更、例えば置換、iii) リン酸部分の「デホスホ」リンカーによる完全な置換、iv) 非標準的な核酸塩基を含む、天然に存在する核酸塩基の修飾または置換、v) リボース-リン酸骨格の置換または修飾、vi) オリゴヌクレオチドの3'末端または5'末端の修飾、例えば、末端リン酸基の除去、修飾、もしくは置換、または部分、キャップ、もしくはリンカーのコンジュゲーション、vii) 糖の修飾または置換、およびviii) ロックされたまたはロック解除された核酸の1つ以上を含めることができる。他の修飾には、シュードウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-アザシチジン、5-ヒドロキシウリジン、5-アミノウリジン5-メチルウリジン、2-チオプソイドウリジン、4-チオプソイドウリジン、5-ヒドロキシプソイドウリジン、5-メチルプセウリジン、5-アミノプセドウリジン、シュードイソシチジン5-メチルシチジンN-4-メチルクチジン、2-チオシチジン、5-アザシチジン5-ヒドロキシシチジン、5-アミノシチジン、N-4-メチルシュードウリジン、2-チオシュードイソシチジン、5-ヒドロキシシュードウリジン、5-アミノシュードウリジン、5-メチルシュードイソシチジン、N-6-メチルアデノシン、7-デアザアデノシン、6-チオグアノシン、7-デアザグアノシン、8-アザグアノシン、6-チオ-7-デアザグアノシン、6-チオ-8-アザグアノシン、7-デアザ-8-アザグアノシン、および6-チオ-7-デアザ-8-アザグアノシンが挙げられる。

【0110】

いくつかの実施形態では、Cas成分は、タイプI、タイプII、またはタイプIIIの成分を含む。特定の実施形態では、Cas成分はヌクレアーゼである。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Cas9またはCpf1である。好ましくは、CasヌクレアーゼはCas9である。いくつかの実施形態において、遺伝子編集分子は、Casタンパク質（例えば、Cpf1、CasX、CasY、C2C2、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas5e (CasD)、Cas6、Cas6e、Cas6f、Cas7、Cas8a1、Cas8a2、Cas8b、Cas8c、Cas9 (Csn1またはCsx12)、Cas10、Cas10d、CasF、CasG、CasH、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1 (CasA)、Cse2 (CasB)、Cse3 (CasE)、Cse4 (CasC)、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、CsF1、CsF2、CsF3、CsF4、Cu1966、またはそれらの同族体または修正バージョン）である。いくつかの実施形態において、Casタンパク質は、Cas9タンパク質（例えば、野生型Cas9、Cas9ニッカーゼ、死滅したCas9 (dCas9)、または分割されたCas9）である。いくつかの実施形態において、Cas9タン

パク質は、*Streptococcus pyogenes* Cas9タンパク質または*Staphylococcus aureus* Cas9タンパク質である。

【0111】

標的配列に誘導されると、Casヌクレアーゼは標的配列を切断する。これにより、DNAの二本鎖切断、またはニッカーゼ酵素が使用されている場合は一本鎖切断が発生する。DNAの二本鎖切断は、切断末端の再ライゲーションである非相同末端結合（NHEJ）を介して修復できる。NHEJはインデル変異を生成する可能性がある。あるいは、DNAは、相同修復（HR）または相同性指向修復（HDR）を介して修復され得る。HRとHDRは、外因的に導入された修復テンプレートの存在下で、標的遺伝子座で正確に定義された変更を生成する。特定の実施形態において、修復テンプレートは、標的遺伝子上の望ましい変異をコードするヌクレオチド配列を含み、ヌクレオチド配列は、遺伝子の標的遺伝子座に挿入される。

10

【0112】

本明細書に開示される配列のいくつかは、以下のリストを含む（国際公開第WO 2017/185054号を参照）。配列番号1～93は、TCF4遺伝子のイントロン3のTNRの5'側の標的配列である。配列番号94～190は、TCF4遺伝子のイントロン3のTNRの3'側の標的配列である。配列番号191～1063は、野生型COL8A2遺伝子の標的配列である。配列番号：1064～1069は、COL8A2Gln455Lys変異の標的配列である。配列番号：1070～1075は、COL8A2Gln455Ala変異の標的配列である。配列番号：1076～1084は、COL8A2Leu450Trp変異の標的配列である。

20

【0113】

表Aは、配列番号：1085～1088の配列を示している（国際公開第WO 2017/185054号の例示的な配列を参照）。

【0114】

ガイドRNAおよびCasコンポーネント（すなわち、CRISPR複合体）は、対象に送達するためにAAVベクターにパッケージ化されている。特定の実施形態において、AAVベクターは、それ自体によって送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスキャプシドに封入され得る。

30

【0115】

いくつかの実施形態において、AAVベクターは、眼に直接送達され得る。AAVベクターは、前眼房、後眼房、角膜、または眼の硝子体房に投与することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、角膜実質、角膜輪部、角膜の上皮表面、または角膜の内皮膜に投与することができる。好ましい実施形態では、AAVベクターは、角膜内皮と直接接触している前房の房水に直接投与される。

【0116】

TCF4遺伝子標的化

TCF4遺伝子は18番染色体上に位置する。細胞形成位置は18q21.2（位置21.2の18番染色体の長腕）である。分子の位置は、18番染色体の塩基対55,222,311から55,635,993にある（Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12 (NCBI)）。

40

【0117】

標的配列は、TCF4遺伝子のTNR内またはTNRに隣接している可能性がある。Casヌクレアーゼは標的配列に誘導される。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、TCF4遺伝子のTNR内の標的配列にガイドされ得る。他の実施形態では、Casヌクレアーゼは、TNRに隣接する標的配列にガイドされ得る。例えば、Casヌクレアーゼは、TNRの5'の標的配列に向けられ得る。または、CasヌクレアーゼはTNRの3'の標的配列に方向付けられてもよい。いくつかの実施形態において、Casタンパク質は、2つ以上のgRNAによって、TNRに隣接する2つの標的配列に方向付け

50

られ得る。いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、2つ以上のgRNAによって2つの標的配列に向けられ得、ここで、一方は、TCF4遺伝子のTNR内にあり、他方は、TCF4遺伝子のTNRに隣接する。TCF4遺伝子の標的配列は、配列番号1～190から選択される。配列番号1～93は、TCF4遺伝子のイントロン3のTNRの5'側の標的配列である。配列番号94～190は、TCF4遺伝子のイントロン3のTNRの3'側の標的配列である。TCF4遺伝子のガイド配列は、配列番号1089～1278から選択される。（配列表を参照）

【0118】

1つ以上のgRNAは、TCF4遺伝子の標的配列に相補的なガイド配列、またはTCF4遺伝子の標的配列の逆相補体を含む。いくつかの実施形態において、gRNA配列は、標的配列と100%相補的または同一である。好ましくは、gRNAのガイド配列とその対応する標的配列との間の相補性または同一性の程度は、少なくとも約50%以上である。例えば、相補性または同一性の程度は、約50%、55%、60%、65%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。

10

【0119】

いくつかの実施形態では、1つのgRNAが使用される。他の実施形態では、2つ以上のgRNAの組み合わせが使用される。特定の実施形態では、TCF4遺伝子のTNRを切除するために、TNRの配列5'を標的とするgRNAが、TNRの配列3'を標的とするgRNAと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態において、配列番号1～93から選択される標的配列に相補的なgRNAは、配列番号94～190から選択される標的配列に相補的なgRNAと共に使用される。表1は、標的配列と対応するガイド配列を示している（国際公開第WO 2017/185054号の実施例1から）。表2は、ガイド配列の組み合わせを示している（国際公開第WO 2017/185054号の実施例1から）。（国際公開第WO 2017/185054号の例示的な配列を参照）

20

【0120】

CRISPR複合体がタンパク質をコードするエンドヌクレオチドを含む実施形態において、エンドヌクレオチドは、1つ以上の転写または翻訳制御配列に作動可能に連結され得る。特定の実施形態では、エンドヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている。プロモーターは、構成的、誘導的、または組織特異的であり得る。構成的プロモーターの例には、サイトメガロウイルス前初期プロモーター（CMV）、シミアンウイルス（SV40）プロモーター、アデノウイルスメジャー後期（MLP）プロモーター、ルース肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、伸長因子-アルファ（EF1a）プロモーター、ユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、チューブリンプロモーター、免疫グロブリンプロモーター、それらの機能的断片、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。誘導性プロモーターの例には、熱ショック、光、化学物質、ペプチド、金属、ステロイド、抗生物質、またはアルコールによって誘導性のものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、プロモーターは、角膜、例えば角膜内皮における発現に特異的なプロモーターなどの組織特異的であり得る。

30

40

【0121】

いくつかの実施形態において、gRNAをコードするヌクレオチド配列は、少なくとも1つの転写または翻訳制御配列に作動可能に連結され得る。これらには、プロモーター、3'UTR、または5'UTRが含まれる。プロモーターは、U6およびH1 Pol II Iプロモーターなどであるがこれらに限定されない、RNAポリメラーゼIII（Pol III）によって認識され得る。Pol IIIプロモーターは、例えば、マウスまたはヒトであり得る。

【0122】

特定の実施形態において、1つ以上のgRNAは、Casタンパク質またはCasタンパク質（例えば、Cas9）（すなわち、CRISPR複合体）をコードするいずれかのエ

50

ンドヌクレオチド配列と組み合わせて、AAVベクターにパッケージ化される。使用されるAAV血清型は特に限定されない。好ましくは、AAVベクターは、AAV5、AAV6、またはAAV8血清型のものである。

【0123】

AAV-CRISPR複合体は、前房内または実質内注射を介して眼に直接送達することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、それ自体によって送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスクャプシドに封入され得る。

【0124】

いくつかの実施形態において、AAVベクターは、眼に直接送達され得る。AAVベクターは、前眼房、後眼房、角膜、または眼の硝子体房に投与することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、角膜実質、角膜輪部、角膜の上皮表面、または角膜の内皮膜に投与することができる。好ましい実施形態では、AAVベクターは、角膜内皮と直接接触している前房の房水に直接投与される。

【0125】

COL8A2遺伝子標的化

COL8A2遺伝子の変異、したがって遺伝子産物の変異もまた、本明細書に記載の方法および組成物で処理することができる。これは、変異を引き起こすCOL8A2遺伝子の特定の配列を標的とするCRISPR複合体を開発することによって行うことができる。

【0126】

いくつかの実施形態において、CRISPR複合体を使用して、COL8A2遺伝子上の標的変異体ヌクレオチド配列を切除し、変異遺伝子産物をコードするDNAのヌクレオチド配列を切除することができる。次に、DNAはNHEJのプロセスで修復され、インデルの生成と変異体対立遺伝子の喪失につながる可能性がある。他の実施形態では、CRISPR複合体の使用は、HR/HDRの外因性テンプレート、またはHR/HDRのテンプレートとして内因性正常対立遺伝子を使用することのいずれかと一緒に行うことができ、その結果、COL8のアルファ2サブユニットのアミノ酸変異を生じる核酸変異が修正される。修正できる変異には、c. 1364C>Aヌクレオチドの変化によって引き起こされるGln455Lys変異、c. 1363-1364CA>GTヌクレオチドの変化によって引き起こされるGln455Val変異、またはc. 1349T>Gヌクレオチドの変化によって引き起こされるLeu450Trp変異が挙げられる。

【0127】

COL8A2遺伝子の標的配列は、COL8A2遺伝子の転写物バリエーション1のNCBI参照配列NM_005202.3を使用して選択できる。この配列は、COL8遺伝子産物のアミノ酸配列の位置455および450に変異を含まず、「野生型」COL8A2遺伝子配列と見なすことができる。標的配列は、Chr1:36097532-36100270(hg38)から選択できる。COL8A2遺伝子の標的配列は、配列番号191-1063から選択される。野生型COL8A2遺伝子の標的配列を表3に示す。これらの標的配列に相補的なガイド配列は、COL8A2遺伝子を標的とするように開発することができる。

【0128】

変異体対立遺伝子のヌクレオチド配列の違いに基づいて、変異体対立遺伝子の標的配列を開発することもできる。表4は、c. 1364C>Aヌクレオチドの変化によって引き起こされるGln155Lys変異に特異的な標的配列を示している（配列番号：1064-1069）。表5は、c. 1363-1364CA>GTヌクレオチドの変化によって引き起こされるGln455Val変異に特異的な標的配列を示している（配列番号：1070-1075）。表6は、c. 1349T>Gヌクレオチドの変化によって引き起こされるLeu450Trp変異に特異的な標的配列を示している（配列番号：1076-1084）。変異体対立遺伝子は、標的配列に相補的なガイド配列を含む、または標的配列の逆相補体に相補的なガイド配列を含むgRNAを使用して標的化することができる。

10

20

30

40

50

【0129】

特定の実施形態において、1つ以上のgRNAは、Casタンパク質をコードするエンドヌクレオチド配列またはCasタンパク質（例えば、Cas9）（すなわち、CRISPR複合体）のいずれかと組み合わせて、AAVベクターにパッケージ化される。使用されるAAV血清型は特に限定されない。好ましくは、AAVベクターは、AAV5、AAV6、またはAAV8血清型のものである。

【0130】

AAV-CRISPR複合体は、前房内または実質内注射を介して眼に直接送達することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、それ自体によって送達され得る。他の実施形態では、AAVベクターは、送達のために脂質ナノ粒子、リポソーム、非脂質ナノ粒子、またはウイルスキャプシドに封入され得る。

10

【0131】

いくつかの実施形態において、AAVベクターは、眼に直接送達され得る。AAVベクターは、前眼房、後眼房、または角膜に投与することができる。特定の実施形態において、AAVベクターは、角膜実質、角膜輪部、角膜の上皮表面、または角膜の内皮膜に投与することができる。好ましい実施形態では、AAVベクターは、角膜内皮と直接接触している前房の房水に直接投与される。

【0132】

例示的な実施形態

特定の実施形態において、変異体対立遺伝子は、標的遺伝子上の標的配列によってコードされる。

20

【0133】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子に相補的である少なくとも1つのヌクレオチド配列は、対象の細胞内の標的遺伝子上の標的配列にハイブリダイズする。

【0134】

特定の実施形態において、標的遺伝子は、TCF4またはCOL8A2である。

【0135】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的配列は、配列番号1～1084からなる群から選択される。

30

【0136】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的配列は、TCF4遺伝子に特異的であり、標的配列は、配列番号1～190から選択される。

【0137】

いくつかの実施形態において、標的配列は、COL8A2遺伝子に特異的であり、標的配列は、配列番号191～1084から選択される。

【0138】

いくつかの実施形態において、核酸編集システムは、CRISPRシステム、siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、またはアンタゴミールRNAである。

【0139】

いくつかの実施形態において、核酸編集システムは、CRISPRシステムである。

40

【0140】

いくつかの実施形態において、核酸編集システムは、CRISPR-Casシステムである。

【0141】

いくつかの実施形態において、CRISPR-Casシステムは、CRISPR関連（Cas）遺伝子をコードするヌクレオチド配列およびガイドRNA（gRNA）をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、Cas遺伝子は、Casタンパク質をコードする。

50

【0143】

いくつかの実施形態において、Cas遺伝子によってコードされるCasタンパク質は、Casヌクレアーゼである。

【0144】

いくつかの実施形態において、Casヌクレアーゼは、Cas9である。

【0145】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、CRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化crRNA (tracrRNAまたはtrRNA) を含む。

【0146】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、単一のガイドRNA (sgRNA) であり、crRNAおよびtracrRNAの両方が、1つのガイドRNA分子上で組み合わされる。

【0147】

いくつかの実施形態において、ガイドRNAは、ダブルガイドRNA (dgRNA) であり、crRNAおよびtracrRNAは、同時に使用されるが、組み合わされない別個のRNA分子上にある。

【0148】

いくつかの実施形態において、CRISPR-Casシステムは、CRISPR-Cas9システムである。

【0149】

いくつかの実施形態において、crRNAおよびtracrRNAは、Cas9ヌクレアーゼをコードするヌクレオチド配列と複合体を形成する。

【0150】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの変異体対立遺伝子に相補的であるヌクレオチド配列は、gRNAである。

【0151】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのガイドRNAは、配列番号1～1084から選択される少なくとも1つの標的配列に相補的であるcrRNA配列を含む。

【0152】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのガイドRNAは、配列番号1089～1278からなる群から選択されるガイド配列を含む。

【0153】

いくつかの実施形態において、送達システム、ベクター、遺伝子編集システム、または組成物は、修復テンプレートをさらに含む。

【0154】

いくつかの実施形態において、修復テンプレートは、DNA修復テンプレート、mRNA修復テンプレート、siRNA修復テンプレート、miRNA修復テンプレート、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド修復テンプレートからなる群から選択される。

【0155】

いくつかの実施形態において、AAVベクター血清型は、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10からなる群から選択される。

【0156】

いくつかの実施形態において、AAVベクター血清型は、AAV5、AAV6、またはAAV8である。

【0157】

いくつかの実施形態において、AAVベクター血清型は、AAV5である。

【0158】

いくつかの実施形態において、AAVベクター血清型は、AAV6である。

【0159】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、A A V ベクター血清型は、A A V 8 である。

【0160】

いくつかの実施形態において、送達システム、ベクター、ヌクレオチドまたは遺伝子編集システム、または組成物は、プロモーターをさらに含む。

【0161】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、A A V 5、A A V 6 または A A V 8 ベクターと共に使用するために最適化されている。

【0162】

いくつかの実施形態において、プロモーターは組織特異的であり、A A V ベクターまたは標的遺伝子上の少なくとも1つの変異体対立遺伝子に相補的である配列であるヌクレオチドと作動可能に連結される場合、眼において活性である。

10

【0163】

いくつかの実施形態において、組織特異的プロモーターは、角膜または他の前眼組織において活性である。

【0164】

いくつかの実施形態において、組織特異的プロモーターは、角膜の内皮において活性である。

【0165】

いくつかの実施形態において、標的遺伝子は、眼の前部において優先的に発現される。好ましくは、標的遺伝子は、角膜で優先的に発現され、最も好ましくは、角膜の内皮で優先的に発現される。

20

【0166】

いくつかの実施形態では、送達システム、ベクター、ヌクレオチドまたは遺伝子編集システム、または組成物は、I C 注射後の眼の前部で優先的に発現される。好ましくは、送達システム、ベクター、ヌクレオチドまたは遺伝子編集システム、または組成物は、I C 注射後、角膜で優先的に発現され、最も好ましくは、角膜の内皮で優先的に発現される。

【0167】

いくつかの実施形態では、送達システム、ベクター、ヌクレオチドまたは遺伝子編集システム、または組成物は、眼の疾患または状態を治療するのに適している。

【0168】

いくつかの実施形態では、眼の疾患または状態は、角膜の疾患または状態である。

30

【0169】

いくつかの実施形態において、角膜の疾患または状態は、表在性角膜ジストロフィー、前部角膜ジストロフィー、角膜実質ジストロフィー、または後部角膜ジストロフィーである。

【0170】

いくつかの実施形態において、角膜の疾患または状態は、後部角膜ジストロフィーである。

【0171】

いくつかの実施形態では、後部角膜ジストロフィーは、フックス内皮角膜ジストロフィー（F E C D；早期および後期の発症の両方）、後部多形性ジストロフィー（P P C D；1型、2型、および3型）、先天性内皮ジストロフィー（1型および2型）、およびX連鎖内皮角膜ジストロフィーである。

40

【0172】

いくつかの実施形態では、角膜ジストロフィーはF E C Dである。

【実施例】

【0173】

実施例1．A A V ベクターの調製と投与の方法

A A V ベクター

野生型A A V 2、A A V 5、A A V 6、A A V 8、およびA A V 9 ベクターは、当技術分

50

野で知られている方法によって作製した。遍在するCAGプロモーターの下でeGFPをコードする各AAV。各AAVは、PBS+0.001%プルロニック酸製剤で 1×10^9 vg/mLで供給された。

【0174】

前房内（IC）注射

成体の雄性C57BL/6Jマウス（10～11週齢）はJackson Laboratoriesから購入した。すべての動物の手順と取り扱いは、動物の使用に関するARVO声明およびRegeneron Pharmaceuticals IACUCがレビューしたプロトコルに従って実施された。腹腔内注射により、マウスをケタミン／キシラジン混合物で麻酔した。眼を滅菌生理食塩水ですすぎ、続いてトロピカミド（瞳孔を拡張するため）を一滴、プロパラカイン（角膜を麻痺させるため）を一滴加えた。引っ張られたガラス針（サンドペーパーで斜角を付けた）が取り付けられたDrummond Scientific Nanoject IIマイクロインジェクションデバイスを使用して、AAV溶液を針に充填し、AAV溶液を各前房に注入するために使用した。ガラス針は、虹彩と平行に角膜を通して前房の房水に注入された。少量の房水を漏出させた。気泡を角膜に押し込み、続いて 1.5×10^9 vgを含む $1.5 \mu\text{L}$ のAAV溶液を押し込んだ。注射後、針を30秒間静止させた後、素早く滑らかに引き抜いた。各動物のOD（右眼）とOS（左眼）の両方に注射した。対照動物は、AAV溶液の代わりにPBS+0.001%プルロン酸の注射を受けた。麻酔から回復するためにマウスを腹側に置いて（漏出とプールを防ぐために）、角膜の乾燥と摩耗を防ぐために、各眼に軟膏を塗布した。

10

20

【0175】

硝子体内注射

成体の雄性C57BL/6Jマウス（10～11週齢）はJackson Laboratoriesから購入した。すべての動物の手順と取り扱いは、動物の使用に関するARVO声明およびRegeneron Pharmaceuticals IACUCがレビューしたプロトコルに従って実施された。腹腔内注射により、マウスをケタミン／キシラジン混合物で麻酔した。眼を滅菌生理食塩水ですすぎ、続いてトロピカミド（瞳孔を拡張するため）を一滴、プロパラカイン（角膜を麻痺させるため）を一滴加えた。引っ張られたガラス針（サンドペーパーで斜角を付けた）を備えたDrummond Scientific Nanoject IIマイクロインジェクションデバイスを使用して、AAV溶液を針に充填し、硝子体房の硝子体液にAAV溶液を注入するために使用した。ガラス針は、角膜輪部の強膜を通して硝子体房に注入した。 1.5×10^9 vgを含む $1.5 \mu\text{L}$ のAAV溶液を、マイクロインジェクションデバイスを使用して硝子体房に注入した。針は素早く滑らかな動きで引き抜いた。各動物のOD（右眼）とOS（左眼）の両方を注射した。対照動物は、AAV溶液の代わりにPBS+0.001%プルロン酸の注射を受けた。麻酔から回復するためにマウスを腹側に置いて（漏出とプールを防ぐために）、角膜の乾燥と摩耗を防ぐために、各眼に軟膏を塗布した。

30

【0176】

実施例2. 眼のさまざまな組織を標的とするタンパク質の特異性の評価。

インビボイメージング

Heidelberg Spectralis HRA+OCT（Heidelberg Engineering, Inc, Germany）を使用して、注射前のベースラインと注射後の時点でインビボイメージングを実施した。マウスに麻酔をかけ、トロピカミドを一滴ずつ眼に適用して瞳孔を拡張させ、続いてプロパラカインを一滴適用して角膜を麻痺させた。各時点で、AAV-eGFP蛍光を検出するための赤外線画像と蛍光画像を網膜眼底後部（+25ジオプター小動物イメージングレンズ）と角膜前部（前眼部モジュール）で撮影した。Heidelberg Spectralis HRA+OCTのFAModalityを使用して、AAV-eGFP注入に起因するeGFPタンパク質の蛍光を検出した。

40

【0177】

50

免疫組織化学

眼球内注射により、AAV5-eGFP、AAV6-eGFP、およびAAV8-eGFPなどのAAV-eGFP注射を受けたマウスを、眼球摘出のために安楽死させた。PBS+0.001%プルロニック酸の眼内注射を受けた対照マウスは、眼球摘出のために安楽死させた。各眼を除核し、4%PFAで4℃にて一晚固定した。眼をPBSで洗浄した後、30%スクロース中4℃にて最低3日間インキュベートした。次に、眼をOCT包埋化合物に包埋し、サンプルのサブセットをHistoserv Inc (Maryland) による断面化のために送付した。AAV-eGFP局在の領域を増幅するために、eGFPの一次抗体を、断面のマウス眼組織を含むスライド上で4℃で一晩インキュベートした。二次抗体をAlexa-Fluor594 (赤) に結合させて、緑色の内因性eGFP非増幅シグナルと区別した。核にラベルを付け、細胞のタイプと領域の識別を支援するために、DAPI (青) がスライドに追加された。

10

【0178】

スライドは、Keyence顕微鏡 (Keyence Corporation of America, Illinois, USA) を使用して画像化された。緑および／または赤の蛍光の領域は、解剖学的な眼の領域と細胞の局在の両方について評価した。

【0179】

eGFPタンパク質測定

眼球内注射によって送達された、AAV5-eGFP、AAV6-eGFP、AAV8-eGFPなどのAAV血清型のそれぞれについての4匹のマウス (全眼) を、眼球摘出のために安楽死させた。PBS+0.001%プルロニック酸を投与された2匹のマウスを、試験された各AAV血清型の対照として含め、眼球摘出のために安楽死させた。各眼は別々に保たれ、個別のサンプルとして処理された。眼を1X細胞抽出バッファ-PTRELSAキットで提供) に浸し、ステンレス鋼ビーズを備えたティッシュライザーを使用してホモジナイズした。サンプルを遠心分離し、溶解物を含むタンパク質を収集した。総タンパク質測定値は、BCAキット (Pierce BCAタンパク質アッセイキット、ThermoFisher) を使用して測定した。GFP SimpleStep ELISAキット (Abcam) を使用して、eGFPタンパク質の発現についてサンプルを3回アッセイした。眼あたりのeGFP発現は、眼から単離された総タンパク質のng/μgとして計算された。

20

30

【0180】

形質導入効率と向性は、使用するAAV血清型によって異なる。Heidelberg Spectralisのインビボイメージングを使用して、IC投与後のAAV形質導入の領域を決定した。AAV2、AAV6、AAV8、およびAAV9は、IC投与後に眼の後部と前部の両方を標的とすることが判明し、AAV2、AAV6、およびAAV9は、前部で最も強いeGFP発現を示すが、AAV5は前眼組織のみを標的とすることが示された。データはまた、AAV5、AAV6、およびAAV8がIC注射後の前部領域に対して強い向性を持っていることを示している。さらに、IC注射後の後方領域へのAAV2およびAAV9の強い向性によって示されるように、IC注射は後方組織にAAVを送達することもできる。

40

【0181】

実施例3. 角膜の内皮細胞における遺伝子変異の修正

角膜の内皮細胞におけるTCF4またはCOL8A2の変異などの標的遺伝子変異の修正は、CRISPR/Cas複合体を含む核酸編集システムを含む組成物を投与することによって行われる。

【0182】

CRISPR/Cas複合体は、変異を含む標的遺伝子の一部に相補的であり、標的DNA配列に方向付けられたガイド配列と、Casヌクレアーゼをコードするエンドヌクレオチドを含む。

【0183】

50

C R I S P R / C a s 複合体は標的配列に誘導され、C a s ヌクレアーゼは標的配列を切断する。遺伝子挿入変異は、標的配列を切断し、DNAの切断を修復することによって修正される。ヌクレオチドの変化である遺伝子変異は、変異した配列のヌクレオチド配列を切断し、野生型遺伝子のヌクレオチド配列を含む修復テンプレートでDNAを修復することによって修正される。

【0184】

C R I S P R / C a s 複合体は、A A V 5、A A V 6、またはA A V 8などのA A V ベクターにパッケージされていることが好ましい。A A V ベクターは、当技術分野で知られている方法によって生成される。各A A Vは、遍在するC A G プロモーターの下で標的配列をコードする。各A A Vは、P B S + 0.001%プルロニック酸製剤で1e13 g/mLで供給される。

10

【0185】

C R I S P R / C a s 複合体にパッケージされたA A V ベクターは、前房内注射を介して前眼房に直接投与される。そのような変異を持っているマウスは、腹腔内注射によってケタミン／キシラジン混合物で麻酔される。眼を滅菌生理食塩水ですすぎ、続いてトロピカミド（瞳孔を拡張するため）を一滴、プロパラカイン（角膜を麻痺させるため）を一滴加える。引っ張られたガラス針（サンドペーパーで斜角を付けた）が取り付けられたD r u m m o n d S c i e n t i f i c N a n o j e c t I I マイクロインジェクションデバイスを使用して、A A V 溶液が針に充填され、各前房にA A V 溶液を注入するために使用される。ガラス針は、虹彩と平行に角膜を通して前房の房水に注入する。少量の房水が漏れる可能性がある。気泡を角膜に押し込み、続いて1.5e10 v gを含む1.5 μLのA A V 溶液を押し込む。注射後、針を30秒間静止させた後、素早く滑らかに引き抜く。各動物のO D（右眼）とO S（左眼）の両方に注射する。対照動物は、A A V 溶液の代わりにP B S + 0.001%プルロン酸の注射を受ける。麻酔から回復するためにマウスを腹側に置いて（漏れや溜まりを防ぐために）、角膜の乾燥や摩耗を防ぐために、各眼に軟膏を塗布する。

20

【0186】

遺伝子発現の修正は、治療および対照マウスの眼から角膜を解剖すること（および上記角膜から内皮細胞を単離すること）、およびDNAおよび／またはRNA核酸配列決定を行うことによって確認する。

30

【0187】

実施例4—角膜の内皮細胞における遺伝子発現のダウンレギュレーション。

遺伝子発現は、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンスRNA、またはアンタゴミールRNAから選択される、標的遺伝子上の少なくとも1つの対立遺伝子に相補的な少なくとも1つの阻害ヌクレオチド配列を含む組成物を投与することによってダウンレギュレートされる。標的遺伝子は、T C F 4やC O L 8 A 2などの角膜変異遺伝子である。阻害性RNAは、それ自体で、またはC R I S P R / C a s 複合体の一部として組成物に存在する。

【0188】

阻害性RNAは、実施例3と同様にA A V ベクターにパッケージされている。阻害性RNAは、好ましくは、A A V 5、A A V 6またはA A V 8などのA A V ベクターにパッケージングされる。A A V ベクターは、当技術分野で知られている方法によって生成される。各A A Vは、遍在するC A G プロモーターの下で標的配列をコードする。各A A Vは、P B S + 0.001%プルロニック酸製剤で1e13 g/mLで供給される。

40

【0189】

実施例3と同様に、阻害性RNAと共にパッケージされたA A V ベクターは、前房内注射を介して前眼房に直接投与される。腹腔内注射により、マウスをケタミン／キシラジン混合物で麻酔する。眼を滅菌生理食塩水ですすぎ、続いてトロピカミド（瞳孔を拡張するため）を一滴、プロパラカイン（角膜を麻痺させるため）を一滴加える。引っ張られたガラス針（サンドペーパーで斜角を付けた）が取り付けられたD r u m m o n d S c i e n

50

t i f i c N a n o j e c t I I マイクロインジェクションデバイスを使用して、A A V 溶液が針に充填され、各前房に A A V 溶液を注入するために使用される。ガラス針は、虹彩と平行に角膜を通して前房の房水に注入される。少量の房水が漏れる可能性がある。気泡を角膜に押し込み、続いて 1.5×10^{-6} g を含む $1.5 \mu\text{L}$ の A A V 溶液が押し込む。注射後、針を 30 秒間静止させた後、素早く滑らかに引き抜く。各動物の O D (右眼) と O S (左眼) の両方に注射する。対照動物は、A A V 溶液の代わりに P B S + 0.001% プルロン酸の注射を受ける。麻酔から回復するためにマウスを腹側に置いて (漏れや溜まりを防ぐために)、角膜の乾燥や摩耗を防ぐために、各眼に軟膏を塗布する。

【0190】

遺伝子発現のダウンレギュレーションは、治療および対照マウスの眼から角膜を解剖すること、およびウエスタンブロットを介してサンプル中の遺伝子によってコードされるタンパク質の量を測定することによって確認する。遺伝子発現のダウンレギュレーションが成功すると、処理されたマウスと対照マウスの角膜組織でコードされたタンパク質のレベルが低下する。

10

【0191】

本発明を、その好ましい実施形態を含めて詳細に説明した。しかしながら、当業者は、本開示を考慮すると、本発明の範囲および趣旨内で本発明に対して修正および／または改善を行い得ることを理解されたい。

W O 2 0 1 7 / 1 8 5 0 5 4 からの例示的な配列

20

30

40

50

表 A. 配列番号:1085-1088

配列	説明	配列番号
GTTTGTGTGA TTTTGTCTAAA ATGCATCACC AACAGCGAAT GGCTGCCITTA GGGACGGACA AAGAGCTGAG TGATITACTG GATTTCAGTG CGtaagaaa gaacggtgga aactaacaac agctgtgaaa aaaacaaaac aaaacccaa acatttcagc tagaaccag taggaatcfa aaggacagta ataatttta attgtctgaa tcttggtaa atatgaaggt cttttgaca agtttttaac tataatttig tggltgtatg gaagattcag gctttttt tttttgagt ttattactg gccttcaatt ccttaccac tgattacccc aaataatgga atctacccc agtggaaagc aaaaatagac acccctaaaa cttaaccacc ctaaaaactt ggccatgtct gaaccatgag actactaata ctttgacac tactcttcti ttatttati gttttggaa atggaaaata gaaaatagga gaccacgttg tctcttataa gttttaagct aatgatctt tggattggta ggaccigtic ctacatctt acctctagt tacatcttt ctaggatic ttaaaactag tatggatat ctgagcatc attctttaga acctttgga ctgtttgtt aaatttcgta ctgttaggat cagcacaaa cgttgacac cacacttgg gagttttacg gctgtacttg gtctcttcc alccctttgc tctctttcc taaaccaagt eccagacatg tcaggagaat gaattcattt ttaatgccag atgagtttgg tgaagatgc atttgaatg caaaataaaa agaalcaca aaacacaaa ataaaatcca aacgccttc caagtggggc ttcttcatgc tgetgtctgt cgtctgtctg cgtctgtctg cgtctgtctg cgtctgtctg tgetgtctgt gctctctc ctcctctcc tctctctc cctctctc tctagacct tctttggag aaatggcttt cgggaatttt gccaggaaac gtagecclag gcaggcagct tgcagcccc ctttctgtt gttgcattt cctattcgt tctttgctt ttgcaggct ctgactcagg gaaggtgtgc attatccatt agatagctgc aagaagaggg aaaccaatta ggtctgaaat aaatgctgga gagagaggga gtgaaagaga gagtgagagt gagagagaga gagagcttgg ctcaaatig ctcctcgtt agagacgaaa tgagaaitta gtcagggtgg cacttttatt ttatttggg ttcacatag acaggcaaat cctatacgag atggaaatgg acattgccac gttattggcc aaggtttica atataaaca aaacaacttt ttctctcc ttggtgaaac tagtgtttt ctagagaggc tgcgtggctc caactgaat ctgataaca ttatggggag tgtgtttgt ccaaatgtag cagtgtact gcttggccat ctaattgacc tgaagaaaaa gaagaaacag agtgataatg gggcgtggg tggatctgt aatgttgtt ccttttagt ttaagtgg atggtgatgt attttactaa ataaacctt agcataaact ctaagctgtt tggtaacagt atgaaagatc ttgaggagc tctgaaggca caagtgtct ctttcaact gtaatatte ttgttttt tagATGTTT TCACCTCCTG TGAGCAGTGG GAAAAATTGGA CCAACTTCTT TGGCAAGTGG ACATTTTACT GGCTCAA	隣接するエクソン、逆鎖 (GRCh37/hg19) を含む TCF4 イントロン 3 配列。一般にイントロン 3 と呼ばれるが、このイントロンがすべての転写産物の 3 番目と 4 番目のエクソンの間に収まらないように、遺伝子の選択的スプライシングされたアイソフォームが多数存在する。太字は ctg リピート (TNR) を示す。この領域のサイズは可変である。大文字は、隣接する 5' および 3' エクソンの配列を示す。	1085
mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUm UmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU	sgRNA 修飾配列 「N」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり得る。 * = PS リンケージ; 「m」= 2' -O-Me スクレオチド。	1086
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG	crRNA 配列 「N」は、任意の天然または非天然ヌクレオチドであり得る。	1087
AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU	trRNA 配列	1088

50

【表 4 - 1】

表 1. TCF4 標的配列と対応するガイド配列

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
1	TTGGCAAGTGGAC ATTTTACTGG	Chr18:55585285- 55585307	-	TCF4 の TNR の 5'	-871	1089	UUGGCAAGUG GACAUUUUAC
2	TGTCCTACTTGCCA AAGAACTTGG	Chr18:55585294- 55585316	+	TCF4 の TNR の 5'	-862	1090	UGUCCACUUG CCAAAGAAAGU
3	GGACCTACTT CTTTGGCAAGTGG	Chr18:55585297- 55585319	-	TCF4 の TNR の 5'	-859	1091	GGACCAACUU CUUUGGCAAG
4	GAAAAATGGA CCAACTTCTTTGG	Chr18:55585304- 55585326	-	TCF4 の TNR の 5'	-852	1092	GAAAAAUGGA CCAAACUUCUU
5	CCATTTTTC CACTGCTCACAGG	Chr18:55585318- 55585340	+	TCF4 の TNR の 5'	-838	1093	CCAUUUUUUCC CACUGCUCAC
6	CCGTGTGAGCA GTGGGAAAATGG	Chr18:55585318- 55585340	-	TCF4 の TNR の 5'	-838	1094	CCUGUGAGCA GUGGGAATAA
7	TTTTTCCCAC TGCTCACAGGAGG	Chr18:55585321- 55585343	+	TCF4 の TNR の 5'	-835	1095	UUUUUCCCAC UGCUCACAGG
8	TTTCACCTCC TGTGAGCAGTGGG	Chr18:55585326- 55585348	-	TCF4 の TNR の 5'	-830	1096	UUUCACCUCC UGUGAGCAGU
9	TTTTCACTC CTGTGAGCAGTGG	Chr18:55585327- 55585349	-	TCF4 の TNR の 5'	-829	1097	UUUUCACCUCC CUGUGAGCAG
10	AGATCTTTGA GGAGCTCTGAAGG	Chr18:55585399- 55585421	-	TCF4 の TNR の 5'	-757	1098	AGAUCUUUGA GGAGCUCUGA
11	AACAGTATCA AAGATCTTTGAGG	Chr18:55585410- 55585432	-	TCF4 の TNR の 5'	-746	1099	AACAGUAUGA AAGAUCUUUG
12	AGCATAAACT CTAAGCTGTTTGG	Chr18:55585434- 55585456	-	TCF4 の TNR の 5'	-722	1100	AGCAUAAACU CUAAGCUGUU

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
13	ACAGCTTAGA GTTATGCTAAGG	Chr18:55585438- 55585460	+	TCF4 の TNR の 5'	-718	1101	ACAGCUUAGA GUUUAUGCUA
14	CAGCTTAGAG TTTATGCTAAGG	Chr18:55585439- 55585461	+	TCF4 の TNR の 5'	-717	1102	CAGCUUAGAG UUUAUGCUAA
15	TCTTTTAGTT TTAAGTTGGATGG	Chr18:55585483- 55585505	-	TCF4 の TNR の 5'	-673	1103	UCUUUUAGUU UUUAGUUGGA
16	TTTCTCTTTT AGTTTAAAGTTGG	Chr18:55585487- 55585509	-	TCF4 の TNR の 5'	-669	1104	UUUCUCUUUU AGUUUUUAGU
17	GTGATAATGG GGGCTGGGTGGG	Chr18:55585523- 55585545	-	TCF4 の TNR の 5'	-633	1105	GUGAUAAUGG GGGCUGGGGU
18	AGTGATAATG GGGCTGGGTGGG	Chr18:55585524- 55585546	-	TCF4 の TNR の 5'	-632	1106	AGUGAUAAUG GGGCUGGGGG
19	CAGAGTGATA ATGGGGCTGGGG	Chr18:55585527- 55585549	-	TCF4 の TNR の 5'	-629	1107	CAGAGUGAUA AUGGGGGCUG
20	ACAGAGTGAT AATGGGGCTGGG	Chr18:55585528- 55585550	-	TCF4 の TNR の 5'	-628	1108	ACAGAGUGAU AAUGGGGGCU
21	AACAGAGTGA TAATGGGGCTGG	Chr18:55585529- 55585551	-	TCF4 の TNR の 5'	-627	1109	AACAGAGUGA UAAUUGGGGC
22	AAAGAACAGA GTGATAATGGGG	Chr18:55585533- 55585555	-	TCF4 の TNR の 5'	-623	1110	AAAGAACAGA GUGAUAAUUG
23	GAAAGAACAG AGTGATAATGGGG	Chr18:55585534- 55585556	-	TCF4 の TNR の 5'	-622	1111	GAAAGAACAG AGUGAUAAUG
24	AGAAAGAAC GAGTGATAATGGG	Chr18:55585535- 55585557	-	TCF4 の TNR の 5'	-621	1112	AGAAAGAAC GAGUGAUAAU
25	AAGAAAGAAC AGAGTGATAATGG	Chr18:55585536- 55585558	-	TCF4 の TNR の 5'	-620	1113	AAGAAAGAAC AGAGUGAUAA
26	TCTGTTCTTT CTTTTTCCTCAGG	Chr18:55585546- 55585568	+	TCF4 の TNR の 5'	-610	1114	UCUGUUCUUU CUUUUUCCUC

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

配列番号	標的配列 (PAMを含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
27	TTTTCCTCAG GTTCAATTAGATGG	Chr18:55585558- 55585580	+	TCF4 の TNR の 5'	-598	1115	UUUCCUCAG GUUCAUUAGA
28	TGGCCCATCT AATGAACCTGAGG	Chr18:55585562- 55585584	-	TCF4 の TNR の 5'	-594	1116	UUGGCCAUCU AAUGAACCCUG
29	AATGTAGCAG TAGTACTGCTTGG	Chr18:55585581- 55585603	-	TCF4 の TNR の 5'	-575	1117	AAUGUAGCAG UAGUACUGCU
30	AGCAGTACTA CTGCTACATTGG	Chr18:55585584- 55585606	+	TCF4 の TNR の 5'	-572	1118	AGCAGUACUA CUGCUACAUU
31	TGAATCTTGA TAACATTATGGGG	Chr18:55585619- 55585641	-	TCF4 の TNR の 5'	-537	1119	UGAAUCUUGA UAACAUAUUG
32	CTGAATCTTG ATAACATTATGGG	Chr18:55585620- 55585642	-	TCF4 の TNR の 5'	-536	1120	CUGAAUCUUG AUAACAUAU
33	CCATAATGTT ATCAAGATTTCAGG	Chr18:55585621- 55585643	+	TCF4 の TNR の 5'	-535	1121	CCAUAAUGUU AUCAAGAUUC
34	CCTGAATCTT GATAACATTATGG	Chr18:55585621- 55585643	-	TCF4 の TNR の 5'	-535	1122	CCUGAAUCUU GAUAAACAUUA
35	AATGTTATCA AGATTCAGGTTGG	Chr18:55585625- 55585647	+	TCF4 の TNR の 5'	-531	1123	AAUGUUAUCA AGAUUCAGGU
36	GTTATCAAGA TTCAGGTTGGAGG	Chr18:55585628- 55585650	+	TCF4 の TNR の 5'	-528	1124	GUUAUCAAGA UUCAGGUUGG
37	TGTTTTTCTA GAGAGGCTGCTGG	Chr18:55585651- 55585673	-	TCF4 の TNR の 5'	-505	1125	UGUUUUUCUA GAGAGGCUGC
38	AAACTAGTGT TTTTCTAGAGAGG	Chr18:55585658- 55585680	-	TCF4 の TNR の 5'	-498	1126	AAACUAGUGU UUUUCUAGAG
39	GAAAAAACA AGTTTCACCAAGG	Chr18:55585666- 55585688	+	TCF4 の TNR の 5'	-490	1127	GAAAAACACU AGUUUCACCA
40	AACAACTTTT TTCTTCTCCTTGG	Chr18:55585683- 55585705	-	TCF4 の TNR の 5'	-473	1128	AACAACUUUU UUCUUCUCCU

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
41	TTGTTTATA TTGAAACCTTGG	Chr18:55585706- 55585728	+	TCF4 の TNR の 5'	-450	1129	UUGUUUAUA UUGAAAACCU
42	GAAACCTTG GCCATAAACGTGG	Chr18:55585718- 55585740	+	TCF4 の TNR の 5'	-438	1130	GAAAACCUUG GCCAUAAACG
43	CATTGCCACG TTTATGGCCAAGG	Chr18:55585723- 55585745	-	TCF4 の TNR の 5'	-433	1131	CAUUGCCACG UUUAUGGCCA
44	AATGGACATT GCCACGTTTATGG	Chr18:55585729- 55585751	-	TCF4 の TNR の 5'	-427	1132	AAUGGACAUU GCCACGUUUA
45	TGTCCTATTC CATCTCGTATAGG	Chr18:55585744- 55585766	+	TCF4 の TNR の 5'	-412	1133	UGUCCAUUUC CAUCUCGUAU
46	AATCCTATAC GAGATGGAAATGG	Chr18:55585747- 55585769	-	TCF4 の TNR の 5'	-409	1134	AAUCCAUUAC GAGAUGGAAA
47	CAGGCAAAATC CTATACGAGATGG	Chr18:55585753- 55585775	-	TCF4 の TNR の 5'	-403	1135	CAGGCAAAUC CUAUACGAGA
48	TATTTGGGTT CACATATGACAGG	Chr18:55585772- 55585794	-	TCF4 の TNR の 5'	-384	1136	UAUUUGGGUU CACAUUAUGAC
49	TGGCACTTTT ATTTTATTTGGG	Chr18:55585787- 55585809	-	TCF4 の TNR の 5'	-369	1137	UGGCACUUUU AUUUUUUAUUU
50	GTGGCACTTT TATTTTATTTGG	Chr18:55585788- 55585810	-	TCF4 の TNR の 5'	-368	1138	GUGGCACUUU UAUUUUUAUUU
51	AAATGAGAAT TTAGTGCAGGTGG	Chr18:55585807- 55585829	-	TCF4 の TNR の 5'	-349	1139	AAAUGAGAAU UUAGUGCAGG
52	ACGAAATGAG AATTAGTGCAGG	Chr18:55585810- 55585832	-	TCF4 の TNR の 5'	-346	1140	ACGAAAUGAG AAUUUAGUGC
53	ATTCTCATTT CGTCTTAACAGG	Chr18:55585820- 55585842	+	TCF4 の TNR の 5'	-336	1141	AUUCUCAUUU CGUCUCUAAC
54	AAATAAATGC TGGAGAGAGAGGG	Chr18:55585898- 55585920	-	TCF4 の TNR の 5'	-258	1142	AAAUAAAUGC UGGAGAGAGA

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

配列番号	標的配列 (PAMを含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNRの開始までの距離	配列番号	ガイド配列
55	GAAATAAATG CTGGAGAGAGG	Chr18:55585899- 55585921	-	TCF4のTNRの5'	-257	1143	GAAAAAUAUG CUGGAGAGAG
56	ATTAGGGTCG AAATAAATGCTGG	Chr18:55585908- 55585930	-	TCF4のTNRの5'	-248	1144	AUUAGGGGUCG AAAAAUAUUGC
57	GCATTTATTT CGACCCTAATTGG	Chr18:55585911- 55585933	+	TCF4のTNRの5'	-245	1145	GCAUUUAUUU CGACCCUAUU
58	AAGAAAGAGG AAACCAATTAGG	Chr18:55585924- 55585946	-	TCF4のTNRの5'	-232	1146	AAGAAAGAGGG AAACCAAUUA
59	GAAAGAAAGG GAAACCAATTAGG	Chr18:55585925- 55585947	-	TCF4のTNRの5'	-231	1147	GAAAGAAAGG GAAACCAAUU
60	ACTAGATACG TCGAAAGAAAGG	Chr18:55585937- 55585959	-	TCF4のTNRの5'	-219	1148	ACUAGAUACG UCGAAAGAAGA
61	CACTAGATAC GTCGAAAGAAAGG	Chr18:55585938- 55585960	-	TCF4のTNRの5'	-218	1149	CACUAGAUAC GUCGAAAGAAG
62	CTCTTCTTCG ACGTATCTAGTGG	Chr18:55585939- 55585961	+	TCF4のTNRの5'	-217	1150	CUCUUUCUUG ACGUAUCUAG
63	TGCAGGCTCT GACTCAGGGAAGG	Chr18:55585972- 55585994	-	TCF4のTNRの5'	-184	1151	UGCAGGCUCU GACUCAGGGA
64	TTTTTGCAGG CTCTGACTCAGG	Chr18:55585976- 55585998	-	TCF4のTNRの5'	-180	1152	UUUUUUGCAG CUCUGACUCA
65	CTTTTTCAG GCTCTGACTCAGG	Chr18:55585977- 55585999	-	TCF4のTNRの5'	-179	1153	UUUUUUGCAG GCUCUGACUC
66	TCAGAGCCTG CAAAAAGCAAAGG	Chr18:55585983- 55586005	+	TCF4のTNRの5'	-173	1154	UCAGAGCCUG CAAAAAGCAA
67	TTCTGTTCTT TGCTTTTTCAGG	Chr18:55585989- 55586011	-	TCF4のTNRの5'	-167	1155	UUCGUUCCUU UGCUUUUUUGC
68	GCAAAAAGCA AAGGAACGAATGG	Chr18:55585992- 55586014	+	TCF4のTNRの5'	-164	1156	GCAAAAAGCA AAGGAACGAA

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
69	AGAAAGTGCA ACAAGCAGAAAGG	Chr18:55586015- 55586037	+	TCF4 の TNR の 5'	-141	1157	AGAAAGUGCA ACAAGCAGAA
70	GAAAGTGCAA CAAGCAGAAAGG	Chr18:55586016- 55586038	+	TCF4 の TNR の 5'	-140	1158	GAAAGUGCAA CAAGCAGAAA
71	AAAGTGCAAC AAGCAGAAAGGG	Chr18:55586017- 55586039	+	TCF4 の TNR の 5'	-139	1159	AAAGUGCAAC AAGCAGAAAG
72	AAGTGCAACA AGCAGAAAGGGG	Chr18:55586018- 55586040	+	TCF4 の TNR の 5'	-138	1160	AAAGUGCAACA AGCAGAAAGG
73	GGCTGCAAG CTGCCTGCCTAGG	Chr18:55586039- 55586061	+	TCF4 の TNR の 5'	-117	1161	GGCUGCAAAG CUGCCUGCCU
74	GCTGCAAGC TGCCCTGCCTAGG	Chr18:55586040- 55586062	+	TCF4 の TNR の 5'	-116	1162	GCUGCAAAGC UGCCUGCCUA
75	CAGGAAAGT AGCCCTAGGCAGG	Chr18:55586052- 55586074	-	TCF4 の TNR の 5'	-104	1163	CAGGAAACGU AGCCUAGGC
76	CTGCCTAGGG CTACGTTTCCTGG	Chr18:55586053- 55586075	+	TCF4 の TNR の 5'	-103	1164	CUGCCUAGGG CUACGUUUC
77	TTGCCAGGAA ACGTAGCCCTAGG	Chr18:55586056- 55586078	-	TCF4 の TNR の 5'	-100	1165	UUGCCAGGAA ACGUAGCCCU
78	TGGCTTTCGG AAGTTTTCCTAGG	Chr18:55586071- 55586093	-	TCF4 の TNR の 5'	-85	1166	UGGCUUUCGG AAGUUUUGCC
79	TCTTTTGGAG AAATGGCTTTCGG	Chr18:55586084- 55586106	-	TCF4 の TNR の 5'	-72	1167	UCUUUUUGGAG AAAUUGGCUUU
80	AAAGCCATT CTCCAAAGAGAGG	Chr18:55586087- 55586109	+	TCF4 の TNR の 5'	-69	1168	AAAGCCAUUU CUCCAAAGA
81	TAGACCTTCT TTTGGAGAAATGG	Chr18:55586091- 55586113	-	TCF4 の TNR の 5'	-65	1169	UAGACCUUCU UUUGGAGAAA
82	TCCAAAAGAA GGTCTAGAAAGAGG	Chr18:55586098- 55586120	+	TCF4 の TNR の 5'	-58	1170	UCCAAAAGAA GGCUAGAGAG

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
83	TCCTCTTCTA GACCTTCTTTGG	Chr18:5586099- 5586121	-	TCF4 の TNR の 5'	-57	1171	UCCUCUUCUA GACCUUCUUU
84	AAAAGAAAGT CTAGAAAGAGGAGG	Chr18:5586101- 5586123	+	TCF4 の TNR の 5'	-55	1172	AAAAGAAAGGU CUAGAAAGAGG
85	AGAAAGTCTA GAAAGAGGAGGAGG	Chr18:5586104- 5586126	+	TCF4 の TNR の 5'	-52	1173	AGAAAGGUUCUA GAAAGAGGAGG
86	AGGTCTAGAA GAGGAGGAGGAGG	Chr18:5586107- 5586129	+	TCF4 の TNR の 5'	-49	1174	AGGUCUAGAA GAGGAGGAGG
87	TCTAGAAAGAG GAGGAGGAGGAGG	Chr18:5586110- 5586132	+	TCF4 の TNR の 5'	-46	1175	UCUAGAAAGAG GAGGAGGAGG
88	AGAGGAGGAG GAGGAGGAGAGG	Chr18:5586116- 5586138	+	TCF4 の TNR の 5'	-40	1176	AGAGGAGGAG GAGGAGGAGA
89	GGAGGAGGAG GAGGAGAAAGGAGG	Chr18:5586119- 5586141	+	TCF4 の TNR の 5'	-37	1177	GGAGGAGGAG GAGGAGAAAGG
90	GGAGGAGGAG GAGAAAGGAGGAGG	Chr18:5586122- 5586144	+	TCF4 の TNR の 5'	-34	1178	GGAGGAGGAG GAGAAAGGAGG
91	GGAGGAGGAG AAGGAGGAGGAGG	Chr18:5586125- 5586147	+	TCF4 の TNR の 5'	-31	1179	GGAGGAGGAG AAGGAGGAGG
92	GGAGGAGAGAG GAGGAGGAGGAGG	Chr18:5586128- 5586150	+	TCF4 の TNR の 5'	-28	1180	GGAGGAGAGAG GAGGAGGAGG
93	GGAGAAAGGAG GAGGAGGAGGAGG	Chr18:5586131- 5586153	+	TCF4 の TNR の 5'	-25	1181	GGAGAAAGGAG GAGGAGGAGG
94	CAGCATGAAA GAGCCCCACTTGG	Chr18:5586225- 5586247	+	TCF4 の TNR の 3'	69	1182	CAGCAUGAAA GAGCCCCACU
95	ATGAAAGAGC CCCACTTGGAGG	Chr18:5586229- 5586251	+	TCF4 の TNR の 3'	73	1183	AUGAAAGAGC CCCACUUGGA
96	AAAGAGCCCC ACTTGGAAAGGCGG	Chr18:5586232- 5586254	+	TCF4 の TNR の 3'	76	1184	AAAGAGCCCC ACUUGGAAGG

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
97	GCCCCACTTG GAAGGCGGTTTGG	Chr18:55586237- 55586259	+	TCF4 の TNR の 3'	81	1185	GCCCCACUUG GAAGGCGGUU
98	TCCAAACCGC CTTCCAAGTG GGG	Chr18:55586238- 55586260	-	TCF4 の TNR の 3'	82	1186	UCCAAACCGC CUUCCAAGUG
99	ATCCAAACCG CCTTCCAAGTGGG	Chr18:55586239- 55586261	-	TCF4 の TNR の 3'	83	1187	AUCCAAACCG CCUCCAAGU
100	AATCCAAACC GCCTTCCAAGTGG	Chr18:55586240- 55586262	-	TCF4 の TNR の 3'	84	1188	AAUCCAAACC GCCUCCAAG
101	GATTTTATTT GTGTGTTTTGTGG	Chr18:55586259- 55586281	+	TCF4 の TNR の 3'	103	1189	GAUUUUAUUU GUGUGUUUUG
102	CATCTTACAC CAAACTCATCTGG	Chr18:55586308- 55586330	+	TCF4 の TNR の 3'	152	1190	CAUCUUACAC CAAACUCAUC
103	TTTTTAATGC CAGATGAGTTTGG	Chr18:55586317- 55586339	-	TCF4 の TNR の 3'	161	1191	UUUUUAAUGC CAGAUGAGUU
104	ATTCAATCTC CTGACATGCTCTGG	Chr18:55586343- 55586365	+	TCF4 の TNR の 3'	187	1192	AUUCAUUCUC CUGACAUGUC
105	TTCATTCTCC TGACATGCTCTGGG	Chr18:55586344- 55586366	+	TCF4 の TNR の 3'	188	1193	UUCAUUCUCC UGACAUGUCU
106	CTCCTGACAT GTCTGGGACTTGG	Chr18:55586350- 55586372	+	TCF4 の TNR の 3'	194	1194	CUCCUGACAU GUCUGGGACU
107	AACCAAGTCC CAGACATGTCAGG	Chr18:55586352- 55586374	-	TCF4 の TNR の 3'	196	1195	AACCAAGUCC CAGACAUGUC
108	ACATGTCTGG GACTTGGTTTAGG	Chr18:55586356- 55586378	+	TCF4 の TNR の 3'	200	1196	ACAUGUCUGG GACUUGGUUU
109	CTGGGACTTG GTTTAGGAAAAGG	Chr18:55586362- 55586384	+	TCF4 の TNR の 3'	206	1197	CUGGGACUUG GUUAGGAAA

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
110	GGTTTAGGAA AAGGAAGCAAAGG	Chr18:55586371- 55586393	+	TCF4 の TNR の 3'	215	1198	GUUUUAGGAA AAGGAAGCAA
111	GTTTAGGAAA AGGAAGCAAAGG	Chr18:55586372- 55586394	+	TCF4 の TNR の 3'	216	1199	GUUUUAGGAAA AGGAAGCAA
112	AGGAAAAGGA AGCAAAAGGATGG	Chr18:55586376- 55586398	+	TCF4 の TNR の 3'	220	1200	AGGAAAAGGA AGCAAAAGGA
113	AGGAAGCAAA GGGATGGAGAAGG	Chr18:55586382- 55586404	+	TCF4 の TNR の 3'	226	1201	AGGAAGCAAA GGGAUGGAGA
114	TGGAGTTTAA CGGCTGTACTTGG	Chr18:55586406- 55586428	-	TCF4 の TNR の 3'	250	1202	UGGAGUUUUA CGGCUGUACU
115	GACACACTTG TGGAGTTTACGG	Chr18:55586416- 55586438	-	TCF4 の TNR の 3'	260	1203	GACACACUUG UGGAGUUUUA
116	AGCGGAACCT GACACACTTGTGG	Chr18:55586426- 55586448	-	TCF4 の TNR の 3'	270	1204	AGCGGAACUU GACACACUUG
117	GTCGTAGGAT CAGCACAAAGCGG	Chr18:55586444- 55586466	-	TCF4 の TNR の 3'	288	1205	GUCGUAGGAU CAGCACAAAG
118	TTGGTAAATTT TCGTAGTCGTAGG	Chr18:55586459- 55586481	-	TCF4 の TNR の 3'	303	1206	UUGGUAAAUU UCGUAGUCGU
119	ATTACCAAA ACAGTCCAAAAGG	Chr18:55586473- 55586495	+	TCF4 の TNR の 3'	317	1207	AUUUACCAAA ACAGUCCAAA
120	TAGAACCTTT TGGACTGTTTGG	Chr18:55586478- 55586500	-	TCF4 の TNR の 3'	322	1208	UAGAACCUUU UGGACUGUUU
121	ATACATCTTT TAGAACCTTTTGG	Chr18:55586488- 55586510	-	TCF4 の TNR の 3'	332	1209	AUACAUCUUU UAGAACCUUU
122	TAGGATCTTT AAAACCTAGTATGG	Chr18:55586522- 55586544	-	TCF4 の TNR の 3'	366	1210	UAGGAUUCUU AAAACUAGUA
123	ATACTAGTTT TAAGAAATCCTAGG	Chr18:55586524- 55586546	+	TCF4 の TNR の 3'	368	1211	AUACUAGUUU UAAAGAAUCCU

10

20

30

40

50

【表 4 - 10】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
124	TCCTAGGAAA AGATGTAAC TAGG	Chr18:55586540- 55586562	+	TCF4 の TNR の 3'	384	1212	UCCUAGGAAA AGAUGUAAACU
125	TCCTAGTTAC ATCTTTTCCTAGG	Chr18:55586541- 55586563	-	TCF4 の TNR の 3'	385	1213	UCCUAGUUAC AUCUUUUCCU
126	TAGGAAAAAGA TGTAAC TAGGAGG	Chr18:55586543- 55586565	+	TCF4 の TNR の 3'	387	1214	UAGGAAAAAGA UGUAACUAGG
127	TAACTAGGAG GTAAGATGTAAGG	Chr18:55586555- 55586577	+	TCF4 の TNR の 3'	399	1215	UAACUAGGAG GUAAGAUGUA
128	GGAGGTAAGA TGTAAGGAACAGG	Chr18:55586561- 55586583	+	TCF4 の TNR の 3'	405	1216	GGAGGUAAGA UGUAAGGAAC
129	TAATGATGCT TTGGATTGGTAGG	Chr18:55586585- 55586607	-	TCF4 の TNR の 3'	429	1217	UAAUGAUGCU UUGGAUUGGU
130	AAGCTAATGA TGCTTTGGATTGG	Chr18:55586589- 55586611	-	TCF4 の TNR の 3'	433	1218	AAGCUAAUGA UGCUUUUGAU
131	GTTTTAAGCT AATGATGCTTTGG	Chr18:55586594- 55586616	-	TCF4 の TNR の 3'	438	1219	GUUUUAAAGCU AAUGAUGCUU
132	TAAACTTTTA AAGAGACAACTGG	Chr18:55586611- 55586633	+	TCF4 の TNR の 3'	455	1220	UAAAACUUUA AAGAGACAAC
133	AAAACCTTAA AGAGACAACTGGG	Chr18:55586612- 55586634	+	TCF4 の TNR の 3'	456	1221	AAAAACUUUA AGAGACAACU
134	GGAATGGAA AATAGAAAAATAGG	Chr18:55586638- 55586660	-	TCF4 の TNR の 3'	482	1222	GGAAAUGGAA AAUAGAAAAU
135	TTATTTATTG TTTTTGGAAATGG	Chr18:55586653- 55586675	-	TCF4 の TNR の 3'	497	1223	UUUUUUUUG UUUUUGGAAA
136	TTCGTTTTAT TTATTGTTTTTGG	Chr18:55586659- 55586681	-	TCF4 の TNR の 3'	503	1224	UUCGUUUUAU UUUUUGUUUU
137	GTAGTCTCAG TGTT CAGACATGG	Chr18:55586702- 55586724	+	TCF4 の TNR の 3'	546	1225	GUAGUCUCAG UGUUUCAGACA

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 1】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
138	TTCAGACATG GCCAAGTTTAGG	Chr18:55586714- 55586736	+	TCF4 の TNR の 3'	558	1226	UUCAGACAUG GCCAAGUUUU
139	TCAGACATGG CCAAGTTTAGGG	Chr18:55586715- 55586737	+	TCF4 の TNR の 3'	559	1227	UCAGACAUGG CCAAGUUUUA
140	CAGACATGGC CAAGTTTAGGGG	Chr18:55586716- 55586738	+	TCF4 の TNR の 3'	560	1228	CAGACAUGGC CAAGUUUUAG
141	ACATGGCCAA GTTTTAGGGGTGG	Chr18:55586719- 55586741	+	TCF4 の TNR の 3'	563	1229	ACAUGGCCAA GUUUUAGGGG
142	ACTAAACCCAC CCCTAAAACTTGG	Chr18:55586725- 55586747	-	TCF4 の TNR の 3'	569	1230	ACUAAACCAC CCCUAAAAACU
143	TTTAGGGGTG GTTTAGTTTAGG	Chr18:55586731- 55586753	+	TCF4 の TNR の 3'	575	1231	UUUAGGGGUG GUUUAGUUUU
144	TTAGGGGTGG TTTAGTTTAGGG	Chr18:55586732- 55586754	+	TCF4 の TNR の 3'	576	1232	UUAGGGGUGG UUUAGUUUUA
145	TAGGGGTGGT TTAGTTTAGGGG	Chr18:55586733- 55586755	+	TCF4 の TNR の 3'	577	1233	UAGGGGUGGU UUAGUUUUAG
146	TGCTATTTT TGCTTCCACTGG	Chr18:55586756- 55586778	+	TCF4 の TNR の 3'	600	1234	UGUCUAUUUU UGCUUUCCAC
147	GTCTATTTT GCTTCCACTGGG	Chr18:55586757- 55586779	+	TCF4 の TNR の 3'	601	1235	GUCUAUUUUU GCUUUCCACU
148	TCTATTTTGG CTTCCACTGGGG	Chr18:55586758- 55586780	+	TCF4 の TNR の 3'	602	1236	UCUAUUUUUG CUUUCCACUG
149	ATAATGGAAT CTCACCCAGTGG	Chr18:55586772- 55586794	-	TCF4 の TNR の 3'	616	1237	AUAAUGGAAU CUCACCCACG
150	TGGGGTGAGA TTCATTATTGG	Chr18:55586776- 55586798	+	TCF4 の TNR の 3'	620	1238	UGGGGUGAGA UUCCAUUUAU
151	GGGGTGAGAT TCCATTATTGGG	Chr18:55586777- 55586799	+	TCF4 の TNR の 3'	621	1239	GGGGUGAGAU UCCAUAUUUU

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 2】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
152	GGGTGAGATT CCATTATTTGGGG	Chr18:55586778- 55586800	+	TCF4 の TNR の 3'	622	1240	GGGUGAGAUU CCAUUAUUUG
153	CCATTATTTG GGTAATCAGTGG	Chr18:55586788- 55586810	+	TCF4 の TNR の 3'	632	1241	CCAUUAUUUG GGUAUAUCAG
154	CCACTGATTA CCCCAAATAATGG	Chr18:55586788- 55586810	-	TCF4 の TNR の 3'	632	1242	CCACUGAUUA CCCCAAAUAA
155	CATTATTTGG GGTAATCAGTGGG	Chr18:55586789- 55586811	+	TCF4 の TNR の 3'	633	1243	CAUUAUUUGG GGUAUAUCAGU
156	ATTTGGGGTA ATCAGTGGGTAGG	Chr18:55586793- 55586815	+	TCF4 の TNR の 3'	637	1244	AUUUGGGGUA AUCAGUGGGU
157	TTTGGGGTAA TCAGTGGGTAGGG	Chr18:55586794- 55586816	+	TCF4 の TNR の 3'	638	1245	UUUGGGGUAA UCAGUGGGUA
158	ATCAGTGGGT AGGGAATTGAAGG	Chr18:55586803- 55586825	+	TCF4 の TNR の 3'	647	1246	AUCAGUGGGU AGGGAUUUGA
159	TTTTTTTTGA GTTTATTACTGG	Chr18:55586826- 55586848	-	TCF4 の TNR の 3'	670	1247	UUUUUUUUGA GUUUUAUUAC
160	TGTGGTGTGA TGGAAAGATTCAGG	Chr18:55586856- 55586878	-	TCF4 の TNR の 3'	700	1248	UGUGGUGUGA UGGAAGAUUC
161	ACTATAATTT TGTGGTGTGATGG	Chr18:55586866- 55586888	-	TCF4 の TNR の 3'	710	1249	ACUAUAAUUU UGUGGUGUGA
162	AGTTTTTAAC TATAATTTTGTGG	Chr18:55586874- 55586896	-	TCF4 の TNR の 3'	718	1250	AGUUUUUAAC UAUAAUUUUUG
163	AAAGACCTTC ATATTACCAAGG	Chr18:55586903- 55586925	+	TCF4 の TNR の 3'	747	1251	AAAGACCUUC AUUUUAACCA
164	TGAATCCTTG GTAAATATGAAGG	Chr18:55586908- 55586930	-	TCF4 の TNR の 3'	752	1252	UGAAUCCUUG GUAAAUAUGA
165	TTTTTAATTG GCTGAATCCTTG	Chr18:55586920- 55586942	-	TCF4 の TNR の 3'	764	1253	UUUUUAAUUG GCUGAAUCCU

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 3】

配列番号	標的配列 (PAM を含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNR の開始までの距離	配列番号	ガイド配列
166	GGACAGTAAT AATTTTAAATTGG	Chr18:5586932- 5586954	-	TCF4 の TNR の 3'	776	1254	GGACAGUAAU AAUUUUAAU
167	ACTGTCCTTT AGATTCTACTGG	Chr18:5586948- 5586970	+	TCF4 の TNR の 3'	792	1255	ACUGUCCUUU AGAUAUCCUAC
168	AGAAACCCAGT AGGAATCTAAAGG	Chr18:5586953- 5586975	-	TCF4 の TNR の 3'	797	1256	AGAAACCCAGU AGGAUAUCUAA
169	CACATTCAGCT AGAAACCCAGTAGG	Chr18:5586963- 5586985	-	TCF4 の TNR の 3'	807	1257	CACUUCAGCU AGAAACCCAGU
170	TGGTTTCTAG CTGAAGTGTTTGG	Chr18:5586968- 5586990	+	TCF4 の TNR の 3'	812	1258	UGGUUUCUAG CUGAAGUGUU
171	GGTTTCTAGC TGAAGTGTTTGGG	Chr18:5586969- 5586991	+	TCF4 の TNR の 3'	813	1259	GGUUUCUAGC UGAAGUGUUU
172	AGTGCGGTAA GAAAGAACGGTGG	Chr18:5587028- 5587050	-	TCF4 の TNR の 3'	872	1260	AGUGCGGUAA GAAAGAACGG
173	TTCAGTGCGG TAAGAAAGAACGG	Chr18:5587031- 5587053	-	TCF4 の TNR の 3'	875	1261	UUCAGUGCGG UAAAGAAAGAA
174	TGATTTACTG GATTTCAAGTGGG	Chr18:5587044- 5587066	-	TCF4 の TNR の 3'	888	1262	UGAUUUACUG GAUUUCAGUG
175	CAAGAGCTG AGTGATTTACTGG	Chr18:5587056- 5587078	-	TCF4 の TNR の 3'	900	1263	CAAAGAGCUG AGUGAUUUAC
176	CAGCTCTTTG TCCGTCCCTAAGG	Chr18:5587069- 5587091	+	TCF4 の TNR の 3'	913	1264	CAGCUCUUUG UCCGUCCCUA
177	GCGAATGGCT GCCTTAGGGACGG	Chr18:5587080- 5587102	-	TCF4 の TNR の 3'	924	1265	GCGAAUGGCU GCCUUAGGGA
178	AACAGCGAAT GGCTGCCTTAGGG	Chr18:5587084- 5587106	-	TCF4 の TNR の 3'	928	1266	AACAGCGAAU GGCUGCCUUA
179	CAACAGCGAA TGGCTGCCTTAGG	Chr18:5587085- 5587107	-	TCF4 の TNR の 3'	929	1267	CAACAGCGAA UGGCUGCCUU

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 4】

配列番号	標的配列 (PAMを含む)	染色体の位置	鎖	配向	TNRの開始までの距離	配列番号	ガイド配列
180	CTAAGGCAGC CATTCGCTGTTGG	Chr18:55587086- 55587108	+	TCF4 の TNR の 3'	930	1268	CUAAGGCAGC CAUUCGCUGU
181	AATGCATCAC CAACAGCGAATGG	Chr18:55587095- 55587117	-	TCF4 の TNR の 3'	939	1269	AAUGCAUCAC CAACAGCGAA
182	ATCACACAAA CCTAGAAACATGG	Chr18:55587126- 55587148	+	TCF4 の TNR の 3'	970	1270	AUCACACAAA CCUAGAAAACA
183	GCGGTTATTT CCATGTTTCTAGG	Chr18:55587136- 55587158	-	TCF4 の TNR の 3'	980	1271	GCGGUUAUUU CCAUGUUUCU
184	GGGACTGGAT TTTCTGATTGCGG	Chr18:55587155- 55587177	-	TCF4 の TNR の 3'	999	1272	GGGACUGGAU UUUCUGAUUG
185	GAAAATCCAG TCCCAATCCTTGG	Chr18:55587164- 55587186	+	TCF4 の TNR の 3'	1008	1273	GAAAUAUCCAG UCCCAAUCCU
186	TTTTCTCCAA GGATTGGGACTGG	Chr18:55587170- 55587192	-	TCF4 の TNR の 3'	1014	1274	UUUUCUCCAA GGAUUGGGAC
187	TTGTGTTTTC TCCAAGGATTGGG	Chr18:55587175- 55587197	-	TCF4 の TNR の 3'	1019	1275	UUGUGUUUUC UCCAAGGAUU
188	ATTGTGTTTT CTCCAAGGATTGG	Chr18:55587176- 55587198	-	TCF4 の TNR の 3'	1020	1276	AUUGUGUUUU CUCCAAGGAU
189	ATCCTTGGAG AAACACAATCGG	Chr18:55587179- 55587201	+	TCF4 の TNR の 3'	1023	1277	AUCCUUGGAG AAAACACAUAU
190	ATCCGATTGT GTTTTCTCCAAGG	Chr18:55587181- 55587203	-	TCF4 の TNR の 3'	1025	1278	AUCCGAUUGU GUUUUCUCCA

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 2. TCF4 ガイド配列の組み合わせ

配列番号 (5' 標的配列)	配列番号 (3' 標的配列)
8 3	1 0 9
8 5	1 0 9
8 6	1 1 2
8 5	1 2 5
8 6	1 0 9
8 5	1 0 7
8 3	1 2 5
8 6	1 2 5
8 6	1 0 7
6 4	1 0 6
8 5	1 1 4
8 6	1 1 4
8 3	1 1 4
5 3	1 1 4
8 3	1 1 2
7 4	1 1 4
8 5	1 0 8
8 3	1 0 7
8 5	1 1 5
5 8	1 0 9
8 6	1 0 8
8 3	9 6
7 4	1 0 9
7 7	1 1 5
5 3	9 6
8 3	1 0 8
7 4	1 2 5
8 5	9 4
8 6	9 6
5 3	1 0 7
8 3	9 4
7 1	1 1 5
7 7	9 6
5 8	1 1 2
7 7	1 0 9
8 5	9 5

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

配列番号 (5' 標の配列)	配列番号 (3' 標の配列)
5 3	9 4
7 7	9 5
8 6	1 1 5
8 5	9 6
5 8	9 4
5 8	1 1 5
7 1	9 6
5 8	1 0 7
8 3	9 5
5 8	9 6
7 7	9 4
5 6	9 4
7 7	1 0 8
7 7	1 1 2
8 6	9 4
7 7	1 0 7
8 6	9 5
5 6	9 6
5 4	9 4
7 1	9 4
7 7	1 1 4
7 1	1 1 4
5 6	9 5
5 8	9 5
5 3	1 1 2
7 1	1 0 9
7 4	1 1 2
5 4	9 6
5 8	1 1 4
7 4	1 0 8
5 3	1 0 8
7 4	1 0 7
7 4	9 4
7 1	1 0 7
7 1	9 5
7 1	1 1 2
7 4	9 6

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

配列番号 (5' 標の配列)	配列番号 (3' 標の配列)
7 4	9 5
7 4	1 1 5
5 4	9 5
5 3	9 5
7 7	1 2 5
5 4	1 1 2
5 6	1 1 4
7 3	1 0 1
5 4	1 0 9
5 4	1 1 4
5 4	1 0 7
5 4	1 0 8
5 4	1 1 5
5 6	1 0 9
5 6	1 0 7
5 6	1 0 8
5 6	1 1 2
5 6	1 1 5
5 6	1 2 5
5 3	1 2 5

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 3. 野生型COL8A2遺伝子の標的配列

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
191	Chr1:36097532-36097554	+	GGGGAGGAGGCCAGGGCAGCAGG
192	Chr1:36097545-36097567	+	GGGCAGCAGGACCCCCCGCGG
193	Chr1:36097546-36097568	+	GGCAGCAGGACCCCCCGCGGG
194	Chr1:36097554-36097576	+	GACCCCCCGCGGGTTATGTGG
195	Chr1:36097555-36097577	+	ACCCCCCGCGGGTTATGTGGG
196	Chr1:36097556-36097578	+	CCCCCGCGCGGGTTATGTGGGG
197	Chr1:36097556-36097578	-	CCCCACATAACCCGCGGGGGGG
198	Chr1:36097557-36097579	-	GCCCCACATAACCCGCGGGGGGG
199	Chr1:36097558-36097580	-	TGCCCCACATAACCCGCGGGGGG
200	Chr1:36097559-36097581	-	CTGCCCCACATAACCCGCGGGGG
201	Chr1:36097560-36097582	-	TCTGCCCCACATAACCCGCGGGG
202	Chr1:36097561-36097583	-	CTCTGCCCCACATAACCCGCGGG
203	Chr1:36097562-36097584	-	GCTCTGCCCCACATAACCCGCGG
204	Chr1:36097578-36097600	+	GCAGAGCAAGAATCCTGAAAAGG
205	Chr1:36097581-36097603	+	GAGCAAGAATCCTGAAAAGGAGG
206	Chr1:36097586-36097608	+	AGAATCCTGAAAAGGAGGAGTGG
207	Chr1:36097591-36097613	-	TACATCCACTCCTCTTTTCAGG
208	Chr1:36097599-36097621	+	GGAGGAGTGGATGTACTCCGTGG
209	Chr1:36097607-36097629	+	GGATGTACTCCGTGGAGTAGAGG
210	Chr1:36097614-36097636	+	CTCCGTGGAGTAGAGGCCGTTGG
211	Chr1:36097616-36097638	-	GGCCAACGGCCTCTACTCCACGG
212	Chr1:36097619-36097641	+	TGGAGTAGAGGCCGTTGGCCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
213	Chr1:36097627-36097649	+	AGGCCGTTGGCCTGGTCCGACGG
214	Chr1:36097630-36097652	-	ATGCCGTCGGACCAGGCCAACGG
215	Chr1:36097637-36097659	-	GGTGCAGATGCCGTCGGACCAGG
216	Chr1:36097643-36097665	-	GGTCTGGGTGCAGATGCCGTCGG
217	Chr1:36097646-36097668	+	ACGGCATCTGCACCCAGACCTGG
218	Chr1:36097653-36097675	+	CTGCACCCAGACCTGGTCGTTGG
219	Chr1:36097654-36097676	+	TGCACCCAGACCTGGTCGTTGGG
220	Chr1:36097658-36097680	-	GCGGCCCAACGACCAGGTCTGGG
221	Chr1:36097659-36097681	-	TGCGGCCCAACGACCAGGTCTGG
222	Chr1:36097664-36097686	+	CCTGGTCGTTGGGCCGAGCTGG
223	Chr1:36097664-36097686	-	CCAGCTGCGGCCCAACGACCAGG
224	Chr1:36097671-36097693	+	GTTGGGCCGAGCTGGAGCACGG
225	Chr1:36097677-36097699	-	GTGGGGCCGTGCTCCAGCTGCGG
226	Chr1:36097688-36097710	+	GCACGGCCCCACCAGATGCCTGG
227	Chr1:36097694-36097716	+	CCCCACCAGATGCCTGGTCCAGG
228	Chr1:36097694-36097716	-	CCTGGACCAGGCATCTGGTGGGG
229	Chr1:36097695-36097717	-	ACCTGGACCAGGCATCTGGTGGG
230	Chr1:36097696-36097718	-	TACCTGGACCAGGCATCTGGTGG
231	Chr1:36097699-36097721	-	GGCTACCTGGACCAGGCATCTGG
232	Chr1:36097706-36097728	-	CAAGAAGGGCTACCTGGACCAGG
233	Chr1:36097712-36097734	-	TGAGTACAAGAAGGGCTACCTGG
234	Chr1:36097719-36097741	+	GCCCTTCTGTACTCATCGTAGG
235	Chr1:36097720-36097742	-	ACCTACGATGAGTACAAGAAGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
236	Chr1:36097721-36097743	-	TACCTACGATGAGTACAAGAAGG
237	Chr1:36097725-36097747	+	CTTGTA CT CATCGTAGGTATAGG
238	Chr1:36097728-36097750	+	GTACTCATCGTAGGTATAGGTGG
239	Chr1:36097732-36097754	+	TCATCGTAGGTATAGGTGGCCGG
240	Chr1:36097751-36097773	+	CCGGCACGTTGTTCTTGTACAGG
241	Chr1:36097751-36097773	-	CCTGTACAAGAACAACGTGCCGG
242	Chr1:36097752-36097774	+	CGGCACGTTGTTCTTGTACAGGG
243	Chr1:36097767-36097789	+	GTACAGGGCCACCCACACGTTGG
244	Chr1:36097775-36097797	-	CAAGGGCACCAACGTGTGGGTGG
245	Chr1:36097778-36097800	-	CGTCAAGGGCACCAACGTGTGGG
246	Chr1:36097779-36097801	-	ACGTCAAGGGCACCAACGTGTGG
247	Chr1:36097787-36097809	+	TGGTGCCCTTGACGTGCACATGG
248	Chr1:36097792-36097814	-	GCTTACCATGTGCACGTCAAGGG
249	Chr1:36097793-36097815	-	TGCTTACCATGTGCACGTCAAGG
250	Chr1:36097816-36097838	+	AAGTAGTAGACGCCGCCACAGG
251	Chr1:36097817-36097839	+	AGTAGTAGACGCCGCCACAGGG
252	Chr1:36097821-36097843	+	GTAGACGCCGCCACAGGGCAGG
253	Chr1:36097828-36097850	-	ATCTTCACCTGCCCTGTGGGCGG
254	Chr1:36097831-36097853	-	GGCATCTTCACCTGCCCTGTGGG
255	Chr1:36097832-36097854	-	TGGCATCTTCACCTGCCCTGTGG
256	Chr1:36097836-36097858	+	AGGGCAGGTGAAGATGCCAGTGG
257	Chr1:36097840-36097862	+	CAGGTGAAGATGCCAGTGGCTGG
258	Chr1:36097841-36097863	+	AGGTGAAGATGCCAGTGGCTGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
259	Chr1:36097852-36097874	-	AGCGGCTACAACCCAGCCACTGG
260	Chr1:36097856-36097878	+	TGGCTGGGTTGTAGCCGCTGTGG
261	Chr1:36097870-36097892	-	ACTCTCTACAATGGCCACAGCGG
262	Chr1:36097874-36097896	+	TGTGGCCATTGTAGAGAGTCCGG
263	Chr1:36097879-36097901	-	TTTGACCGGACTCTCTACAATGG
264	Chr1:36097887-36097909	+	GAGAGTCCGGTCAAATTTACCGG
265	Chr1:36097888-36097910	+	AGAGTCCGGTCAAATTTACGGG
266	Chr1:36097893-36097915	-	GCATGCCCCGTGAAATTTGACCGG
267	Chr1:36097899-36097921	+	AAATTTACGGGCATGCCCCGAGG
268	Chr1:36097902-36097924	+	TTTACGGGCATGCCCCGAGGCGG
269	Chr1:36097903-36097925	+	TTACGGGCATGCCCCGAGGCGGG
270	Chr1:36097904-36097926	+	TCACGGGCATGCCCCGAGGCGGGG
271	Chr1:36097908-36097930	+	GGGCATGCCCCGAGGCGGGGAAGG
272	Chr1:36097909-36097931	+	GGCATGCCCCGAGGCGGGGAAGGG
273	Chr1:36097914-36097936	+	GCCCCGAGGCGGGGAAGGGCGAGG
274	Chr1:36097915-36097937	-	ACCTCGCCCTTCCCCGCCTCGGG
275	Chr1:36097916-36097938	-	CACCTCGCCCTTCCCCGCCTCGG
276	Chr1:36097932-36097954	+	CGAGGTGAGCACCGCAGTGAAGG
277	Chr1:36097936-36097958	+	GTGAGCACCGCAGTGAAGGCCGG
278	Chr1:36097941-36097963	+	CACCGCAGTGAAGGCCGGTGTGG
279	Chr1:36097943-36097965	-	TGCCACACCGGCCTTCACTGCGG
280	Chr1:36097946-36097968	+	CAGTGAAGGCCGGTGTGGCATGG
281	Chr1:36097947-36097969	+	AGTGAAGGCCGGTGTGGCATGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
282	Chr1:36097955-36097977	-	GCTGTCTGCCCATGCCACACCGG
283	Chr1:36097975-36097997	+	AGCTCGCCCAGCCCAAAGTGTGG
284	Chr1:36097981-36098003	-	GGCAAGCCACAGTTTGGGCTGGG
285	Chr1:36097982-36098004	-	GGGCAAGCCACAGTTTGGGCTGG
286	Chr1:36097986-36098008	-	AGGGGGGCAAGCCACAGTTTGGG
287	Chr1:36097987-36098009	-	AAGGGGGGCAAGCCACAGTTTGG
288	Chr1:36097998-36098020	+	CTTGCCCCCTTGCCCAGCACGG
289	Chr1:36098002-36098024	-	GGTGCCGTGCTGGGCAAGGGGGG
290	Chr1:36098003-36098025	-	GGGTGCCGTGCTGGGCAAGGGGG
291	Chr1:36098004-36098026	-	AGGGTGCCGTGCTGGGCAAGGGG
292	Chr1:36098005-36098027	-	GAGGGTGCCGTGCTGGGCAAGGG
293	Chr1:36098006-36098028	-	GGAGGGTGCCGTGCTGGGCAAGG
294	Chr1:36098011-36098033	-	GGTGTGGAGGGTGCCGTGCTGGG
295	Chr1:36098012-36098034	-	CGGTGTGGAGGGTGCCGTGCTGG
296	Chr1:36098019-36098041	+	GGCACCCTCCACACCGCCGTG
297	Chr1:36098020-36098042	+	GCACCCTCCACACCGCCGTG
298	Chr1:36098023-36098045	-	CTGCCCCAACGGCGGTGTGGAGGG
299	Chr1:36098024-36098046	+	CCTCCACACCGCCGTGCGCAGG
300	Chr1:36098024-36098046	-	CCTGCCCCAACGGCGGTGTGGAGG
301	Chr1:36098027-36098049	-	GCACCTGCCCCAACGGCGGTGTGG
302	Chr1:36098032-36098054	-	GGCTTGACCTGCCCCAACGGCGG
303	Chr1:36098035-36098057	-	GCAGGCTTGACCTGCCCCAACGG
304	Chr1:36098053-36098075	-	TTCGATGAGACTGGCATCGCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
305	Chr1:36098055-36098077	+	TGCGATGCCAGTCTCATCGAAGG
306	Chr1:36098062-36098084	+	CCAGTCTCATCGAAGGCCCCAGG
307	Chr1:36098062-36098084	-	CCTGGGGCCTTCGATGAGACTGG
308	Chr1:36098063-36098085	+	CAGTCTCATCGAAGGCCCCAGGG
309	Chr1:36098064-36098086	+	AGTCTCATCGAAGGCCCCAGGGG
310	Chr1:36098071-36098093	+	TCGAAGGCCCCAGGGGCACCAGG
311	Chr1:36098072-36098094	+	CGAAGGCCCCAGGGGCACCAGGG
312	Chr1:36098073-36098095	+	GAAGGCCCCAGGGGCACCAGGGG
313	Chr1:36098074-36098096	+	AAGGCCCCAGGGGCACCAGGGGG
314	Chr1:36098078-36098100	-	GGGACCCCCTGGTGCCCCCTGGGG
315	Chr1:36098079-36098101	-	CGGGACCCCCTGGTGCCCCCTGGG
316	Chr1:36098080-36098102	+	CCAGGGGCACCAGGGGGTCCCGG
317	Chr1:36098080-36098102	-	CCGGGACCCCCTGGTGCCCCCTGG
318	Chr1:36098081-36098103	+	CAGGGGCACCAGGGGGTCCCGGG
319	Chr1:36098082-36098104	+	AGGGGCACCAGGGGGTCCCGGGG
320	Chr1:36098083-36098105	+	GGGGCACCAGGGGGTCCCGGGGG
321	Chr1:36098088-36098110	+	ACCAGGGGGTCCCGGGGGCCCCG
322	Chr1:36098089-36098111	+	CCAGGGGGTCCCGGGGGCCCCGG
323	Chr1:36098089-36098111	-	CCCGGGCCCCCGGGACCCCCTGG
324	Chr1:36098092-36098114	+	GGGGGTCCCGGGGGCCCGGGAGG
325	Chr1:36098098-36098120	+	CCCGGGGGCCCCGGAGGCCCCCG
326	Chr1:36098098-36098120	-	CCGGGGCCTCCCGGGCCCCCGGG
327	Chr1:36098099-36098121	-	TCCGGGGCCTCCCGGGCCCCCGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
328	Chr1:36098101-36098123	+	GGGGGCCCCGGGAGGCCCCGGAGG
329	Chr1:36098102-36098124	+	GGGGCCCCGGGAGGCCCCGGAGGG
330	Chr1:36098106-36098128	-	CGGGCCCTCCGGGGCCCTCCCGGG
331	Chr1:36098107-36098129	-	ACGGGCCCTCCGGGGCCCTCCCGG
332	Chr1:36098115-36098137	-	CTGGAATCACGGGGCCCTCCGGGG
333	Chr1:36098116-36098138	+	CCCGGAGGGCCCCGTGATTCCAGG
334	Chr1:36098116-36098138	-	CCTGGAATCACGGGGCCCTCCGGG
335	Chr1:36098117-36098139	+	CCGGAGGGCCCCGTGATTCCAGGG
336	Chr1:36098117-36098139	-	CCCTGGAATCACGGGGCCCTCCGG
337	Chr1:36098118-36098140	+	CGGAGGGCCCCGTGATTCCAGGGG
338	Chr1:36098125-36098147	+	CCCGTGATTCCAGGGGAGCCAGG
339	Chr1:36098125-36098147	-	CCTGGCTCCCCTGGAATCACGGG
340	Chr1:36098126-36098148	+	CCGTGATTCCAGGGGAGCCAGGG
341	Chr1:36098126-36098148	-	CCCTGGCTCCCCTGGAATCACGG
342	Chr1:36098134-36098156	+	CCAGGGGAGCCAGGGACCCCTGG
343	Chr1:36098134-36098156	-	CCAGGGGTCCCTGGCTCCCCTGG
344	Chr1:36098135-36098157	+	CAGGGGAGCCAGGGACCCCTGGG
345	Chr1:36098136-36098158	+	AGGGGAGCCAGGGACCCCTGGGG
346	Chr1:36098137-36098159	+	GGGGAGCCAGGGACCCCTGGGGG
347	Chr1:36098143-36098165	-	ACGGGGCCCCCAGGGGTCCCTGG
348	Chr1:36098145-36098167	+	AGGGACCCCTGGGGGCCCCGTGG
349	Chr1:36098146-36098168	+	GGGACCCCTGGGGGCCCCGTGGG
350	Chr1:36098150-36098172	-	TGGGGCCACGGGGCCCCCAGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
351	Chr1:36098151-36098173	-	CTGGGCCCCACGGGGCCCCCAGGG
352	Chr1:36098152-36098174	-	GCTGGGCCCCACGGGGCCCCCAGG
353	Chr1:36098160-36098182	-	CTGGCACGGCTGGGCCCCACGGGG
354	Chr1:36098161-36098183	+	CCCGTGGGCCCAGCCGTGCCAGG
355	Chr1:36098161-36098183	-	CCTGGCACGGCTGGGCCCCACGGG
356	Chr1:36098162-36098184	-	ACCTGGCACGGCTGGGCCCCACGG
357	Chr1:36098169-36098191	-	CAGGGGAACCTGGCACGGCTGGG
358	Chr1:36098170-36098192	-	GCAGGGGAACCTGGCACGGCTGG
359	Chr1:36098174-36098196	-	GAGAGCAGGGGAACCTGGCACGG
360	Chr1:36098179-36098201	-	GAGGGGAGAGCAGGGGAACCTGG
361	Chr1:36098185-36098207	+	TCCCCTGCTCTCCCCTCTCCAGG
362	Chr1:36098186-36098208	+	CCCCTGCTCTCCCCTCTCCAGGG
363	Chr1:36098186-36098208	-	CCCTGGAGAGGGGAGAGCAGGGG
364	Chr1:36098187-36098209	+	CCCTGCTCTCCCCTCTCCAGGGG
365	Chr1:36098187-36098209	-	CCCCTGGAGAGGGGAGAGCAGGG
366	Chr1:36098188-36098210	+	CCTGCTCTCCCCTCTCCAGGGGG
367	Chr1:36098188-36098210	-	CCCCCTGGAGAGGGGAGAGCAGG
368	Chr1:36098194-36098216	+	CTCCCCTCTCCAGGGGGCCCTGG
369	Chr1:36098196-36098218	-	TGCCAGGGCCCCCTGGAGAGGGG
370	Chr1:36098197-36098219	-	CTGCCAGGGCCCCCTGGAGAGGG
371	Chr1:36098198-36098220	+	CCTCTCCAGGGGGCCCTGGCAGG
372	Chr1:36098198-36098220	-	CCTGCCAGGGCCCCCTGGAGAGG
373	Chr1:36098203-36098225	+	CCAGGGGGCCCTGGCAGGCCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
374	Chr1:36098203-36098225	-	CCAGGCCTGCCAGGGCCCCCTGG
375	Chr1:36098211-36098233	-	AGGGGGAACCAGGCCTGCCAGGG
376	Chr1:36098212-36098234	-	AAGGGGGAACCAGGCCTGCCAGG
377	Chr1:36098216-36098238	+	GCAGGCCTGGTTCCCCCTTCAGG
378	Chr1:36098221-36098243	+	CCTGGTTCCCCCTTCAGGCCCGG
379	Chr1:36098221-36098243	-	CCGGGCCTGAAGGGGGAACCAGG
380	Chr1:36098225-36098247	+	GTTCCCCCTTCAGGCCCGGCAGG
381	Chr1:36098228-36098250	-	AGGCCTGCCGGGCCTGAAGGGGG
382	Chr1:36098229-36098251	-	AAGGCCTGCCGGGCCTGAAGGGG
383	Chr1:36098230-36098252	-	CAAGGCCTGCCGGGCCTGAAGGG
384	Chr1:36098231-36098253	+	CCTTCAGGCCCGGCAGGCCTTGG
385	Chr1:36098231-36098253	-	CCAAGGCCTGCCGGGCCTGAAGG
386	Chr1:36098232-36098254	+	CTTCAGGCCCGGCAGGCCTTGGG
387	Chr1:36098233-36098255	+	TTCAGGCCCGGCAGGCCTTGGGG
388	Chr1:36098239-36098261	-	ATTGGGCCCCAAGGCCTGCCGGG
389	Chr1:36098240-36098262	-	TATTGGGCCCCAAGGCCTGCCGG
390	Chr1:36098242-36098264	+	GGCAGGCCTTGGGGCCCAATAGG
391	Chr1:36098243-36098265	+	GCAGGCCTTGGGGCCCAATAGGG
392	Chr1:36098248-36098270	-	GCTGGCCCTATTGGGCCCCAAGG
393	Chr1:36098251-36098273	+	TGGGGCCCAATAGGGCCAGCTGG
394	Chr1:36098256-36098278	-	AGGGTCCAGCTGGCCCTATTGGG
395	Chr1:36098257-36098279	-	CAGGGTCCAGCTGGCCCTATTGG
396	Chr1:36098258-36098280	+	CAATAGGGCCAGCTGGACCCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
397	Chr1:36098266-36098288	+	CCAGCTGGACCCTGGAGTCCTGG
398	Chr1:36098266-36098288	-	CCAGGACTCCAGGGTCCAGCTGG
399	Chr1:36098267-36098289	+	CAGCTGGACCCTGGAGTCCTGGG
400	Chr1:36098275-36098297	-	TCAGGAATCCCAGGACTCCAGGG
401	Chr1:36098276-36098298	-	CTCAGGAATCCCAGGACTCCAGG
402	Chr1:36098277-36098299	+	CTGGAGTCCTGGGATTCTCTGAGG
403	Chr1:36098278-36098300	+	TGGAGTCCTGGGATTCTCTGAGGG
404	Chr1:36098284-36098306	-	AGGGGTCCCTCAGGAATCCCAGG
405	Chr1:36098288-36098310	+	GGATTCTCTGAGGGACCCCTCAGG
406	Chr1:36098293-36098315	+	CCTGAGGGACCCCTCAGGCCAGG
407	Chr1:36098293-36098315	-	CCTGGCCTGAGGGGTCCCTCAGG
408	Chr1:36098302-36098324	+	CCCCTCAGGCCAGGCTGCCAGG
409	Chr1:36098302-36098324	-	CCTGGGCAGCCTGGCCTGAGGGG
410	Chr1:36098303-36098325	+	CCCTCAGGCCAGGCTGCCAGGG
411	Chr1:36098303-36098325	-	CCCTGGGCAGCCTGGCCTGAGGG
412	Chr1:36098304-36098326	-	TCCCTGGGCAGCCTGGCCTGAGG
413	Chr1:36098311-36098333	-	TTGGGGCTCCCTGGGCAGCCTGG
414	Chr1:36098319-36098341	-	AAGGTGACTTGGGGCTCCCTGGG
415	Chr1:36098320-36098342	-	AAAGGTGACTTGGGGCTCCCTGG
416	Chr1:36098328-36098350	-	TGGGGCAGAAAGGTGACTTGGGG
417	Chr1:36098329-36098351	-	CTGGGGCAGAAAGGTGACTTGGG
418	Chr1:36098330-36098352	+	CCAAGTCACCTTTCTGCCCCAGG
419	Chr1:36098330-36098352	-	CCTGGGGCAGAAAGGTGACTTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
420	Chr1:36098331-36098353	+	CAAGTCACCTTTCTGCCCCAGGG
421	Chr1:36098338-36098360	-	GCAGGAGCCCTGGGGCAGAAAGG
422	Chr1:36098346-36098368	-	CAGGGGTGGCAGGAGCCCTGGGG
423	Chr1:36098347-36098369	+	CCCAGGGCTCCTGCCACCCCTGG
424	Chr1:36098347-36098369	-	CCAGGGGTGGCAGGAGCCCTGGG
425	Chr1:36098348-36098370	-	ACCAGGGGTGGCAGGAGCCCTGG
426	Chr1:36098356-36098378	+	CCTGCCACCCCTGGTCCTCCAGG
427	Chr1:36098356-36098378	-	CCTGGAGGACCAGGGGTGGCAGG
428	Chr1:36098357-36098379	+	CTGCCACCCCTGGTCCTCCAGGG
429	Chr1:36098360-36098382	-	TCGCCCTGGAGGACCAGGGGTGG
430	Chr1:36098363-36098385	-	GGGTCGCCCTGGAGGACCAGGGG
431	Chr1:36098364-36098386	-	CGGGTCGCCCTGGAGGACCAGGG
432	Chr1:36098365-36098387	-	ACGGGTGCGCCCTGGAGGACCAGG
433	Chr1:36098371-36098393	-	GGTTTCACGGGTGCGCCCTGGAGG
434	Chr1:36098374-36098396	+	CCAGGGCGACCCGTGAAACCCGG
435	Chr1:36098374-36098396	-	CCGGGTTTCACGGGTGCGCCCTGG
436	Chr1:36098383-36098405	-	AAGGGTGAGCCGGGTTTCACGGG
437	Chr1:36098384-36098406	-	CAAGGGTGAGCCGGGTTTCACGG
438	Chr1:36098385-36098407	+	CGTGAAACCCGGCTCACCCCTTGG
439	Chr1:36098386-36098408	+	GTGAAACCCGGCTCACCCCTTGGG
440	Chr1:36098392-36098414	-	ACTGGGCCCAAGGGTGAGCCGGG
441	Chr1:36098393-36098415	-	AACTGGGCCCAAGGGTGAGCCGG
442	Chr1:36098395-36098417	+	GGCTCACCCCTGGGCCCAAGTTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
443	Chr1:36098401-36098423	+	CCCTTGGGCCCAGTTGGTCCAGG
444	Chr1:36098401-36098423	-	CCTGGACCAACTGGGCCCCAAGGG
445	Chr1:36098402-36098424	+	CCTTGGGCCCAGTTGGTCCAGGG
446	Chr1:36098402-36098424	-	CCCTGGACCAACTGGGCCCCAAGG
447	Chr1:36098403-36098425	+	CTTGGGCCCAGTTGGTCCAGGGG
448	Chr1:36098404-36098426	+	TTGGGCCCAGTTGGTCCAGGGGG
449	Chr1:36098409-36098431	-	ATGGACCCCCTGGACCAACTGGG
450	Chr1:36098410-36098432	-	CATGGACCCCCTGGACCAACTGG
451	Chr1:36098411-36098433	+	CAGTTGGTCCAGGGGGTCCATGG
452	Chr1:36098412-36098434	+	AGTTGGTCCAGGGGGTCCATGGG
453	Chr1:36098419-36098441	+	CCAGGGGGTCCATGGGCCCCAGG
454	Chr1:36098419-36098441	-	CCTGGGGCCCCTGGACCCCCTGG
455	Chr1:36098428-36098450	-	AGGGGACTTCCTGGGGCCCCTGG
456	Chr1:36098435-36098457	-	AGGTGAGAGGGGACTTCCTGGGG
457	Chr1:36098436-36098458	-	CAGGTGAGAGGGGACTTCCTGGG
458	Chr1:36098437-36098459	+	CCAGGAAGTCCCCTCTCACCTGG
459	Chr1:36098437-36098459	-	CCAGGTGAGAGGGGACTTCCTGG
460	Chr1:36098438-36098460	+	CAGGAAGTCCCCTCTCACCTGGG
461	Chr1:36098446-36098468	+	CCCCTCTCACCTGGGACCCCTGG
462	Chr1:36098446-36098468	-	CCAGGGGTCCCAGGTGAGAGGGG
463	Chr1:36098447-36098469	-	ACCAGGGGTCCCAGGTGAGAGGG
464	Chr1:36098448-36098470	-	AACCAGGGGTCCCAGGTGAGAGG
465	Chr1:36098455-36098477	-	GCTGGGAAACCAGGGGTCCCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
466	Chr1:36098459-36098481	+	GGACCCCTGGTTTCCCAGCCAGG
467	Chr1:36098462-36098484	-	TGGCCTGGCTGGGAAACCAGGGG
468	Chr1:36098463-36098485	-	GTGGCCTGGCTGGGAAACCAGGG
469	Chr1:36098464-36098486	-	AGTGGCCTGGCTGGGAAACCAGG
470	Chr1:36098467-36098489	+	GGTTTCCCAGCCAGGCCACTAGG
471	Chr1:36098472-36098494	-	AGGGGCCTAGTGGCCTGGCTGGG
472	Chr1:36098473-36098495	-	CAGGGGCCTAGTGGCCTGGCTGG
473	Chr1:36098474-36098496	+	CAGCCAGGCCACTAGGCCCTGG
474	Chr1:36098477-36098499	-	TGACCAGGGGCCTAGTGGCCTGG
475	Chr1:36098482-36098504	-	CGAGGTGACCAGGGGCCTAGTGG
476	Chr1:36098490-36098512	-	CTGGCATTGAGGTGACCAGGGG
477	Chr1:36098491-36098513	+	CCCTGGTCACCTCGAATGCCAGG
478	Chr1:36098491-36098513	-	CCTGGCATTGAGGTGACCAGGG
479	Chr1:36098492-36098514	-	GCCTGGCATTGAGGTGACCAGG
480	Chr1:36098500-36098522	+	CCTCGAATGCCAGGCACTCCTGG
481	Chr1:36098500-36098522	-	CCAGGAGTGCCTGGCATTGAGG
482	Chr1:36098501-36098523	+	CTCGAATGCCAGGCACTCCTGGG
483	Chr1:36098502-36098524	+	TCGAATGCCAGGCACTCCTGGGG
484	Chr1:36098503-36098525	+	CGAATGCCAGGCACTCCTGGGGG
485	Chr1:36098509-36098531	-	GGAGGACCCCCAGGAGTGCCTGG
486	Chr1:36098512-36098534	+	GGCACTCCTGGGGGTCTCTCCAGG
487	Chr1:36098518-36098540	-	GCAGGGCCTGGAGGACCCCCAGG
488	Chr1:36098527-36098549	-	AAGGGTGAGGCAGGGCCTGGAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 4】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
489	Chr1:36098530-36098552	+	CCAGGCCCTGCCTCACCCCTTAGG
490	Chr1:36098530-36098552	-	CCTAAGGGTGAGGCAGGGCCTGG
491	Chr1:36098535-36098557	-	CTGGGCCTAAGGGTGAGGCAGGG
492	Chr1:36098536-36098558	+	CCTGCCTCACCCCTTAGGCCAGG
493	Chr1:36098536-36098558	-	CCTGGGCCTAAGGGTGAGGCAGG
494	Chr1:36098537-36098559	+	CTGCCTCACCCCTTAGGCCAGGG
495	Chr1:36098538-36098560	+	TGCCTCACCCCTTAGGCCAGGGG
496	Chr1:36098539-36098561	+	GCCTCACCCCTTAGGCCAGGGGG
497	Chr1:36098540-36098562	-	GCCCCCTGGGCCTAAGGGTGAGG
498	Chr1:36098545-36098567	-	CGTGGGCCCCCTGGGCCTAAGGG
499	Chr1:36098546-36098568	-	ACGTGGGCCCCCTGGGCCTAAGG
500	Chr1:36098553-36098575	-	CTGGCAGACGTGGGCCCCCTGGG
501	Chr1:36098554-36098576	+	CCAGGGGGCCACGTCTGCCAGG
502	Chr1:36098554-36098576	-	CCTGGCAGACGTGGGCCCCCTGG
503	Chr1:36098562-36098584	-	CAGGGCTTCCTGGCAGACGTGGG
504	Chr1:36098563-36098585	-	GCAGGGCTTCCTGGCAGACGTGG
505	Chr1:36098572-36098594	+	CCAGGAAGCCCTGCAGACCCAGG
506	Chr1:36098572-36098594	-	CCTGGGTCTGCAGGGCTTCCTGG
507	Chr1:36098580-36098602	-	CTGGACTTCCTGGGTCTGCAGGG
508	Chr1:36098581-36098603	+	CCTGCAGACCCAGGAAGTCCAGG
509	Chr1:36098581-36098603	-	CCTGGACTTCCTGGGTCTGCAGG
510	Chr1:36098582-36098604	+	CTGCAGACCCAGGAAGTCCAGGG
511	Chr1:36098583-36098605	+	TGCAGACCCAGGAAGTCCAGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
512	Chr1:36098584-36098606	+	GCAGACCCAGGAAGTCCAGGGGG
513	Chr1:36098589-36098611	-	GGGGTCCCCCTGGACTTCCTGGG
514	Chr1:36098590-36098612	-	GGGGGTCCCCCTGGACTTCCTGG
515	Chr1:36098599-36098621	-	CAGGGTCTTGGGGGTCCCCCTGG
516	Chr1:36098602-36098624	+	GGGGGACCCCCAAGACCCTGTGG
517	Chr1:36098603-36098625	+	GGGGACCCCCAAGACCCTGTGGG
518	Chr1:36098608-36098630	-	CAGGGCCCCACAGGGTCTTGGGGG
519	Chr1:36098609-36098631	-	GCAGGGCCCCACAGGGTCTTGGGG
520	Chr1:36098610-36098632	-	AGCAGGGCCCCACAGGGTCTTGGG
521	Chr1:36098611-36098633	-	GAGCAGGGCCCCACAGGGTCTTGG
522	Chr1:36098617-36098639	+	CCCTGTGGGCCCTGCTCCCCTGG
523	Chr1:36098617-36098639	-	CCAGGGGAGCAGGGCCCCACAGGG
524	Chr1:36098618-36098640	-	GCCAGGGGAGCAGGGCCCCACAGG
525	Chr1:36098626-36098648	-	GATGGGGAGCCAGGGGAGCAGGG
526	Chr1:36098627-36098649	-	GGATGGGGAGCCAGGGGAGCAGG
527	Chr1:36098633-36098655	-	AGGGGAGGATGGGGAGCCAGGGG
528	Chr1:36098634-36098656	-	CAGGGGAGGATGGGGAGCCAGGG
529	Chr1:36098635-36098657	+	CCTGGCTCCCCATCCTCCCCTGG
530	Chr1:36098635-36098657	-	CCAGGGGAGGATGGGGAGCCAGG
531	Chr1:36098642-36098664	-	GGGTGAGCCAGGGGAGGATGGGG
532	Chr1:36098643-36098665	-	GGGGTGAGCCAGGGGAGGATGGG
533	Chr1:36098644-36098666	-	AGGGGTGAGCCAGGGGAGGATGG
534	Chr1:36098648-36098670	-	GGACAGGGGTGAGCCAGGGGAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 6】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
535	Chr1:36098651-36098673	-	GGGGGACAGGGGTGAGCCAGGGG
536	Chr1:36098652-36098674	-	TGGGGGACAGGGGTGAGCCAGGG
537	Chr1:36098653-36098675	-	TTGGGGGACAGGGGTGAGCCAGG
538	Chr1:36098662-36098684	+	CCCCTGTCCCCCAAGAGTCCTGG
539	Chr1:36098662-36098684	-	CCAGGACTCTTGGGGGACAGGGG
540	Chr1:36098663-36098685	+	CCCTGTCCCCCAAGAGTCCTGGG
541	Chr1:36098663-36098685	-	CCCAGGACTCTTGGGGGACAGGG
542	Chr1:36098664-36098686	-	TCCCAGGACTCTTGGGGGACAGG
543	Chr1:36098669-36098691	-	TGGGGTCCCAGGACTCTTGGGGG
544	Chr1:36098670-36098692	-	CTGGGGTCCCAGGACTCTTGGGG
545	Chr1:36098671-36098693	-	GCTGGGGTCCCAGGACTCTTGGG
546	Chr1:36098672-36098694	-	AGCTGGGGTCCCAGGACTCTTGG
547	Chr1:36098674-36098696	+	AAGAGTCCTGGGACCCCAGCTGG
548	Chr1:36098675-36098697	+	AGAGTCCTGGGACCCCAGCTGGG
549	Chr1:36098680-36098702	-	AGGGGGCCAGCTGGGGTCCCAGG
550	Chr1:36098687-36098709	-	GGGGGACAGGGGCCAGCTGGGG
551	Chr1:36098688-36098710	-	AGGGGGACAGGGGCCAGCTGGG
552	Chr1:36098689-36098711	-	AAGGGGGACAGGGGCCAGCTGG
553	Chr1:36098691-36098713	+	AGCTGGGCCCCTGTCCCCCTTGG
554	Chr1:36098692-36098714	+	GCTGGGCCCCTGTCCCCCTTGGG
555	Chr1:36098693-36098715	+	CTGGGCCCCTGTCCCCCTTGGGG
556	Chr1:36098698-36098720	+	CCCCTGTCCCCCTTGGGGCCTGG
557	Chr1:36098698-36098720	-	CCAGGCCCCAAGGGGGACAGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 7】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
558	Chr1:36098699-36098721	-	GCCAGGCCCAAGGGGGACAGGG
559	Chr1:36098700-36098722	-	TGCCAGGCCCAAGGGGGACAGG
560	Chr1:36098705-36098727	-	AGGACTGCCAGGCCCAAGGGGG
561	Chr1:36098706-36098728	-	CAGGACTGCCAGGCCCAAGGGG
562	Chr1:36098707-36098729	+	CCCTTGGGGCCTGGCAGTCCTGG
563	Chr1:36098707-36098729	-	CCAGGACTGCCAGGCCCAAGGG
564	Chr1:36098708-36098730	-	GCCAGGACTGCCAGGCCCAAGG
565	Chr1:36098716-36098738	-	TATGGGATGCCAGGACTGCCAGG
566	Chr1:36098724-36098746	+	TCCTGGCATCCCATAGCCAGTGG
567	Chr1:36098725-36098747	+	CCTGGCATCCCATAGCCAGTGGG
568	Chr1:36098725-36098747	-	CCCACTGGCTATGGGATGCCAGG
569	Chr1:36098726-36098748	+	CTGGCATCCCATAGCCAGTGGGG
570	Chr1:36098733-36098755	-	TGATAGGCCCCACTGGCTATGGG
571	Chr1:36098734-36098756	-	CTGATAGGCCCCACTGGCTATGG
572	Chr1:36098740-36098762	+	CCAGTGGGGCCTATCAGCCCAGG
573	Chr1:36098740-36098762	-	CCTGGGCTGATAGGCCCCACTGG
574	Chr1:36098741-36098763	+	CAGTGGGGCCTATCAGCCCAGGG
575	Chr1:36098742-36098764	+	AGTGGGGCCTATCAGCCCAGGGG
576	Chr1:36098743-36098765	+	GTGGGGCCTATCAGCCCAGGGGG
577	Chr1:36098744-36098766	+	TGGGGCCTATCAGCCCAGGGGGG
578	Chr1:36098749-36098771	-	CGGGGCCCCCTGGGCTGATAGG
579	Chr1:36098750-36098772	+	CTATCAGCCCAGGGGGGCCCCGG
580	Chr1:36098751-36098773	+	TATCAGCCCAGGGGGGCCCCGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 8】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
581	Chr1:36098757-36098779	-	CAGGGACCCGGGGCCCCCTGGG
582	Chr1:36098758-36098780	+	CCAGGGGGGGCCCCGGGTCCCTGG
583	Chr1:36098758-36098780	-	CCAGGGACCCGGGGCCCCCTGG
584	Chr1:36098767-36098789	-	AAAGGGGAGCCAGGGACCCGGGG
585	Chr1:36098768-36098790	-	CAAAGGGGAGCCAGGGACCCGGG
586	Chr1:36098769-36098791	+	CCGGGTCCCTGGCTCCCCTTTGG
587	Chr1:36098769-36098791	-	CCAAAGGGGAGCCAGGGACCCGG
588	Chr1:36098775-36098797	-	CAGGGGCCAAAGGGGAGCCAGGG
589	Chr1:36098776-36098798	-	TCAGGGGCCAAAGGGGAGCCAGG
590	Chr1:36098779-36098801	+	GGCTCCCCTTTGGCCCCTGATGG
591	Chr1:36098780-36098802	+	GCTCCCCTTTGGCCCCTGATGGG
592	Chr1:36098783-36098805	-	GGGCCCATCAGGGGCCAAAGGGG
593	Chr1:36098784-36098806	-	AGGGCCCATCAGGGGCCAAAGGG
594	Chr1:36098785-36098807	-	CAGGGCCCATCAGGGGCCAAAGG
595	Chr1:36098788-36098810	+	TTGGCCCCTGATGGGCCCTGTGG
596	Chr1:36098792-36098814	-	AGGACCACAGGGCCCATCAGGGG
597	Chr1:36098793-36098815	-	CAGGACCACAGGGCCCATCAGGG
598	Chr1:36098794-36098816	+	CCTGATGGGCCCTGTGGTCCTGG
599	Chr1:36098794-36098816	-	CCAGGACCACAGGGCCCATCAGG
600	Chr1:36098803-36098825	-	GCAGGGTTGCCAGGACCACAGGG
601	Chr1:36098804-36098826	-	AGCAGGGTTGCCAGGACCACAGG
602	Chr1:36098812-36098834	+	CCTGGCAACCCTGCTGCCCTGG
603	Chr1:36098812-36098834	-	CCAGGGGCAGCAGGGTTGCCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 9】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
604	Chr1:36098813-36098835	+	CTGGCAACCCTGCTGCCCCTGGG
605	Chr1:36098820-36098842	-	TGGGAGTCCCAGGGGCAGCAGGG
606	Chr1:36098821-36098843	-	GTGGGAGTCCCAGGGGCAGCAGG
607	Chr1:36098828-36098850	-	AGACGGTGTGGGAGTCCCAGGGG
608	Chr1:36098829-36098851	-	TAGACGGTGTGGGAGTCCCAGGG
609	Chr1:36098830-36098852	-	GTAGACGGTGTGGGAGTCCCAGG
610	Chr1:36098836-36098858	+	ACTCCCACACCGTCTACTCCAGG
611	Chr1:36098839-36098861	+	CCCACACCGTCTACTCCAGGAGG
612	Chr1:36098839-36098861	-	CCTCCTGGAGTAGACGGTGTGGG
613	Chr1:36098840-36098862	-	ACCTCCTGGAGTAGACGGTGTGG
614	Chr1:36098845-36098867	-	AAAGGACCTCCTGGAGTAGACGG
615	Chr1:36098848-36098870	+	TCTACTCCAGGAGGTCCTTTTGG
616	Chr1:36098849-36098871	+	CTACTCCAGGAGGTCCTTTTGGG
617	Chr1:36098854-36098876	-	GTGGGCCCAAAAGGACCTCCTGG
618	Chr1:36098863-36098885	+	CCTTTTGGGGCCACAGCTCCTGG
619	Chr1:36098863-36098885	-	CCAGGAGCTGTGGGCCCAAAAGG
620	Chr1:36098872-36098894	-	AGGGGGGAGCCAGGAGCTGTGGG
621	Chr1:36098873-36098895	-	CAGGGGGGAGCCAGGAGCTGTGG
622	Chr1:36098874-36098896	+	CACAGCTCCTGGCTCCCCCTGG
623	Chr1:36098875-36098897	+	ACAGCTCCTGGCTCCCCCTGGG
624	Chr1:36098876-36098898	+	CAGCTCCTGGCTCCCCCTGGGG
625	Chr1:36098881-36098903	+	CCTGGCTCCCCCTGGGGCCTGG
626	Chr1:36098881-36098903	-	CCAGGCCCCAGGGGGGAGCCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 0】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
627	Chr1:36098888-36098910	-	TGGAGTTCCAGGCCCCAGGGGGG
628	Chr1:36098889-36098911	-	CTGGAGTTCCAGGCCCCAGGGGG
629	Chr1:36098890-36098912	+	CCCCTGGGGCCTGGAATCCAGG
630	Chr1:36098890-36098912	-	CCTGGAGTTCCAGGCCCCAGGGG
631	Chr1:36098891-36098913	-	TCCTGGAGTTCCAGGCCCCAGGG
632	Chr1:36098892-36098914	-	CTCCTGGAGTTCCAGGCCCCAGG
633	Chr1:36098893-36098915	+	CTGGGGCCTGGAATCCAGGAGG
634	Chr1:36098899-36098921	-	TCTGGGCCTCCTGGAGTTCCAGG
635	Chr1:36098908-36098930	-	AAGGGTGAGTCTGGGCCTCCTGG
636	Chr1:36098916-36098938	-	CAGGAGACAAGGGTGAGTCTGGG
637	Chr1:36098917-36098939	+	CCAGACTCACCTTGTCTCCTGG
638	Chr1:36098917-36098939	-	CCAGGAGACAAGGGTGAGTCTGG
639	Chr1:36098918-36098940	+	CAGACTCACCTTGTCTCCTGGG
640	Chr1:36098919-36098941	+	AGACTCACCTTGTCTCCTGGGG
641	Chr1:36098926-36098948	+	CCCTTGTCTCCTGGGGCCCCAGG
642	Chr1:36098926-36098948	-	CCTGGGGCCCCAGGAGACAAGGG
643	Chr1:36098927-36098949	-	TCCTGGGGCCCCAGGAGACAAGG
644	Chr1:36098935-36098957	-	GATGGGCTTCTGGGGCCCCAGG
645	Chr1:36098942-36098964	-	TGGTTTGGATGGGCTTCTGGGG
646	Chr1:36098943-36098965	-	CTGGTTTGGATGGGCTTCTGGG
647	Chr1:36098944-36098966	+	CCAGGAAGCCCATCCAAACCAGG
648	Chr1:36098944-36098966	-	CCTGGTTTGGATGGGCTTCTGG
649	Chr1:36098952-36098974	-	TAGGCAAACCTGGTTTGGATGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 1】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
650	Chr1:36098953-36098975	-	TTAGGCAAACCTGGTTTGGATGG
651	Chr1:36098957-36098979	-	TGGCTTAGGCAAACCTGGTTTGG
652	Chr1:36098962-36098984	+	CCAGGTTTGCCTAAGCCAGCTGG
653	Chr1:36098962-36098984	-	CCAGCTGGCTTAGGCAAACCTGG
654	Chr1:36098968-36098990	+	TTGCCTAAGCCAGCTGGACCAGG
655	Chr1:36098969-36098991	+	TGCCTAAGCCAGCTGGACCAGGG
656	Chr1:36098971-36098993	-	CTCCCTGGTCCAGCTGGCTTAGG
657	Chr1:36098972-36098994	+	CTAAGCCAGCTGGACCAGGGAGG
658	Chr1:36098976-36098998	+	GCCAGCTGGACCAGGGAGGCCGG
659	Chr1:36098977-36098999	+	CCAGCTGGACCAGGGAGGCCGGG
660	Chr1:36098977-36098999	-	CCCGGCCTCCCTGGTCCAGCTGG
661	Chr1:36098978-36099000	+	CAGCTGGACCAGGGAGGCCGGGG
662	Chr1:36098979-36099001	+	AGCTGGACCAGGGAGGCCGGGGG
663	Chr1:36098980-36099002	+	GCTGGACCAGGGAGGCCGGGGGG
664	Chr1:36098981-36099003	+	CTGGACCAGGGAGGCCGGGGGGG
665	Chr1:36098985-36099007	+	ACCAGGGAGGCCGGGGGGGGCCGG
666	Chr1:36098986-36099008	+	CCAGGGAGGCCGGGGGGGGCCGGG
667	Chr1:36098986-36099008	-	CCCGGCCCCCCCCGGCCTCCCTGG
668	Chr1:36098987-36099009	+	CAGGGAGGCCGGGGGGGGCCGGGG
669	Chr1:36098988-36099010	+	AGGGAGGCCGGGGGGGGCCGGGGG
670	Chr1:36098995-36099017	-	GGGGGTGCCCCCGGCCCCCCCGG
671	Chr1:36099004-36099026	+	CCGGGGGCACCCCCCTGCCCTGG
672	Chr1:36099004-36099026	-	CCAGGGCAGGGGGGTGCCCCCGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
673	Chr1:36099005-36099027	+	CGGGGGCACCCCCCTGCCCTGGG
674	Chr1:36099006-36099028	+	GGGGGCACCCCCCTGCCCTGGGG
675	Chr1:36099013-36099035	+	CCCCCTGCCCTGGGGCCCCAGG
676	Chr1:36099013-36099035	-	CCTGGGGCCCCAGGGCAGGGGGG
677	Chr1:36099014-36099036	-	GCCTGGGGCCCCAGGGCAGGGGG
678	Chr1:36099015-36099037	-	TGCCTGGGGCCCCAGGGCAGGGG
679	Chr1:36099016-36099038	-	CTGCCTGGGGCCCCAGGGCAGGG
680	Chr1:36099017-36099039	-	GCTGCCTGGGGCCCCAGGGCAGG
681	Chr1:36099021-36099043	+	CCCTGGGGCCCCAGGCAGCCCGG
682	Chr1:36099021-36099043	-	CCGGGCTGCCTGGGGCCCCAGGG
683	Chr1:36099022-36099044	+	CCTGGGGCCCCAGGCAGCCCGGG
684	Chr1:36099022-36099044	-	CCCGGGCTGCCTGGGGCCCCAGG
685	Chr1:36099026-36099048	+	GGGCCCCAGGCAGCCCGGGCTGG
686	Chr1:36099029-36099051	-	GGGCCAGCCCGGGCTGCCTGGGG
687	Chr1:36099030-36099052	-	TGGGCCAGCCCGGGCTGCCTGGG
688	Chr1:36099031-36099053	-	GTGGGCCAGCCCGGGCTGCCTGG
689	Chr1:36099039-36099061	-	ATAATGGAGTGGGCCAGCCCGGG
690	Chr1:36099040-36099062	-	GATAATGGAGTGGGCCAGCCCGG
691	Chr1:36099049-36099071	-	CTCAAGGGGGATAATGGAGTGGG
692	Chr1:36099050-36099072	+	CCACTCCATTATCCCCCTTGAGG
693	Chr1:36099050-36099072	-	CCTCAAGGGGGATAATGGAGTGG
694	Chr1:36099055-36099077	-	CGAGGCCTCAAGGGGGATAATGG
695	Chr1:36099062-36099084	-	AGGTGATCGAGGCCTCAAGGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
696	Chr1:36099063-36099085	-	CAGGTGATCGAGGCCTCAAGGGG
697	Chr1:36099064-36099086	+	CCCTTGAGGCCTCGATCACCTGG
698	Chr1:36099064-36099086	-	CCAGGTGATCGAGGCCTCAAGGG
699	Chr1:36099065-36099087	+	CCTTGAGGCCTCGATCACCTGGG
700	Chr1:36099065-36099087	-	CCCAGGTGATCGAGGCCTCAAGG
701	Chr1:36099066-36099088	+	CTTGAGGCCTCGATCACCTGGGG
702	Chr1:36099067-36099089	+	TTGAGGCCTCGATCACCTGGGGG
703	Chr1:36099073-36099095	+	CCTCGATCACCTGGGGGCCAGG
704	Chr1:36099073-36099095	-	CCTGGGGCCCCAGGTGATCGAGG
705	Chr1:36099082-36099104	-	CAGGGGGAGCCTGGGGCCCCAGG
706	Chr1:36099083-36099105	+	CTGGGGGGCCAGGCTCCCCCTGG
707	Chr1:36099084-36099106	+	TGGGGGGCCAGGCTCCCCCTGGG
708	Chr1:36099085-36099107	+	GGGGGGCCAGGCTCCCCCTGGGG
709	Chr1:36099090-36099112	-	CAGGGCCCCAGGGGGAGCCTGGG
710	Chr1:36099091-36099113	+	CCAGGCTCCCCCTGGGGCCCTGG
711	Chr1:36099091-36099113	-	CCAGGGCCCCAGGGGGAGCCTGG
712	Chr1:36099098-36099120	-	GGGGGAACCAGGGCCCCAGGGGG
713	Chr1:36099099-36099121	-	AGGGGGAACCAGGGCCCCAGGGG
714	Chr1:36099100-36099122	-	CAGGGGGAACCAGGGCCCCAGGG
715	Chr1:36099101-36099123	+	CCTGGGGCCCTGGTTCCCCCTGG
716	Chr1:36099101-36099123	-	CCAGGGGGAACCAGGGCCCCAGG
717	Chr1:36099108-36099130	-	CAGGATTCCAGGGGGAACCAGGG
718	Chr1:36099109-36099131	+	CCTGGTTCCCCCTGGAATCCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
719	Chr1:36099109-36099131	-	CCAGGATTCCAGGGGGAACCAGG
720	Chr1:36099110-36099132	+	CTGGTTCCCCCTGGAATCCTGGG
721	Chr1:36099111-36099133	+	TGGTTCCCCCTGGAATCCTGGGG
722	Chr1:36099112-36099134	+	GGTTCCCCCTGGAATCCTGGGG
723	Chr1:36099116-36099138	-	AGGGCCCCCAGGATTCCAGGGGG
724	Chr1:36099117-36099139	-	CAGGGCCCCCAGGATTCCAGGGG
725	Chr1:36099118-36099140	+	CCCTGGAATCCTGGGGGCCCTG
726	Chr1:36099118-36099140	-	CCAGGGCCCCCAGGATTCCAGG
727	Chr1:36099119-36099141	-	GCCAGGGCCCCCAGGATTCCAG
728	Chr1:36099127-36099149	-	CAAGGGGTGCCAGGGCCCCCAGG
729	Chr1:36099128-36099150	+	CTGGGGGGCCTGGCACCCCTTGG
730	Chr1:36099129-36099151	+	TGGGGGGCCTGGCACCCCTTGGG
731	Chr1:36099135-36099157	-	CAGGTGCCCAAGGGGTGCCAGGG
732	Chr1:36099136-36099158	+	CCTGGCACCCCTTGGGCACCTGG
733	Chr1:36099136-36099158	-	CCAGGTGCCCAAGGGGTGCCAGG
734	Chr1:36099143-36099165	-	TGGAAAACCAGGTGCCCAAGGGG
735	Chr1:36099144-36099166	-	CTGGAAAACCAGGTGCCCAAGGG
736	Chr1:36099145-36099167	+	CCTTGGGCACCTGGTTTTCAGG
737	Chr1:36099145-36099167	-	CCTGGAAAACCAGGTGCCCAAG
738	Chr1:36099146-36099168	+	CTTGGGCACCTGGTTTTCAGGG
739	Chr1:36099154-36099176	-	ATTACTATCCCTGGAAAACCAGG
740	Chr1:36099162-36099184	+	TCCAGGGATAGTAATGCCTGAG
741	Chr1:36099163-36099185	+	CCAGGGATAGTAATGCCTGAGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
742	Chr1:36099163-36099185	-	CCCTCAGGCATTACTATCCCTGG
743	Chr1:36099164-36099186	+	CAGGGATAGTAATGCCTGAGGGG
744	Chr1:36099169-36099191	+	ATAGTAATGCCTGAGGGGCCCCGG
745	Chr1:36099170-36099192	+	TAGTAATGCCTGAGGGGCCCCGGG
746	Chr1:36099173-36099195	+	TAATGCCTGAGGGGCCCCGGGAGG
747	Chr1:36099178-36099200	+	CCTGAGGGGCCCCGGGAGGCCAGG
748	Chr1:36099178-36099200	-	CCTGGCCTCCCGGGCCCCCTCAGG
749	Chr1:36099179-36099201	+	CTGAGGGGCCCCGGGAGGCCAGGG
750	Chr1:36099180-36099202	+	TGAGGGGCCCCGGGAGGCCAGGGG
751	Chr1:36099181-36099203	+	GAGGGGCCCCGGGAGGCCAGGGGG
752	Chr1:36099187-36099209	+	CCCGGGAGGCCAGGGGGTCTCTGG
753	Chr1:36099187-36099209	-	CCAGGACCCCCTGGCCTCCCGGG
754	Chr1:36099188-36099210	+	CCGGGAGGCCAGGGGGTCTCTGGG
755	Chr1:36099188-36099210	-	CCCAGGACCCCCTGGCCTCCCGG
756	Chr1:36099189-36099211	+	CGGGAGGCCAGGGGGTCTCTGGGG
757	Chr1:36099190-36099212	+	GGGAGGCCAGGGGGTCTCTGGGGG
758	Chr1:36099196-36099218	-	CGGGGACCCCCAGGACCCCCTG
759	Chr1:36099197-36099219	+	CAGGGGGTCTCTGGGGGTCCCCGG
760	Chr1:36099200-36099222	+	GGGGTCTCTGGGGGTCCCCGGAGG
761	Chr1:36099205-36099227	-	CAGGGCCTCCGGGGACCCCCAGG
762	Chr1:36099206-36099228	+	CTGGGGGTCCCCGGAGGCCCTGG
763	Chr1:36099214-36099236	-	CGAGGGGACCAGGGCCTCCGGGG
764	Chr1:36099215-36099237	-	ACGAGGGGACCAGGGCCTCCGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
765	Chr1:36099216-36099238	-	TACGAGGGGACCAGGGCCTCCGG
766	Chr1:36099223-36099245	+	CCCTGGTCCCCCTCGTATTCCTGG
767	Chr1:36099223-36099245	-	CCAGGAATACGAGGGGACCAGGG
768	Chr1:36099224-36099246	-	GCCAGGAATACGAGGGGACCAGG
769	Chr1:36099230-36099252	-	GGGGGAGCCAGGAATACGAGGGG
770	Chr1:36099231-36099253	-	GGGGGGAGCCAGGAATACGAGGG
771	Chr1:36099232-36099254	-	CGGGGGGAGCCAGGAATACGAGG
772	Chr1:36099241-36099263	+	CCTGGCTCCCCCGAAGCCCCGG
773	Chr1:36099241-36099263	-	CCGGGGCTTCGGGGGGAGCCAGG
774	Chr1:36099248-36099270	-	AGGGCAGCCGGGGCTTCGGGGGG
775	Chr1:36099249-36099271	-	CAGGGCAGCCGGGGCTTCGGGGG
776	Chr1:36099250-36099272	+	CCCCGAAGCCCCGGCTGCCCTGG
777	Chr1:36099250-36099272	-	CCAGGGCAGCCGGGGCTTCGGGG
778	Chr1:36099251-36099273	-	ACCAGGGCAGCCGGGGCTTCGGG
779	Chr1:36099252-36099274	-	CACCAGGGCAGCCGGGGCTTCGG
780	Chr1:36099253-36099275	+	CGAAGCCCCGGCTGCCCTGGTGG
781	Chr1:36099258-36099280	-	TCGGGCCACCAGGGCAGCCGGGG
782	Chr1:36099259-36099281	-	GTGGGCCACCAGGGCAGCCGGG
783	Chr1:36099260-36099282	-	GGTCGGGCCACCAGGGCAGCCGG
784	Chr1:36099267-36099289	-	CTGGCAAGGTCGGGCCACCAGGG
785	Chr1:36099268-36099290	+	CCTGGTGCCCCGACCTTGCCAGG
786	Chr1:36099268-36099290	-	CCTGGCAAGGTCGGGCCACCAGG
787	Chr1:36099269-36099291	+	CTGGTGCCCCGACCTTGCCAGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
788	Chr1:36099276-36099298	-	CAGGGCTCCCTGGCAAGGTCGGG
789	Chr1:36099277-36099299	+	CCGACCTTGCCAGGGAGCCCTGG
790	Chr1:36099277-36099299	-	CCAGGGCTCCCTGGCAAGGTCGG
791	Chr1:36099278-36099300	+	CGACCTTGCCAGGGAGCCCTGGG
792	Chr1:36099279-36099301	+	GACCTTGCCAGGGAGCCCTGGGG
793	Chr1:36099280-36099302	+	ACCTTGCCAGGGAGCCCTGGGGG
794	Chr1:36099281-36099303	-	TCCCCCAGGGCTCCCTGGCAAGG
795	Chr1:36099286-36099308	-	GCTGGTCCCCCAGGGCTCCCTGG
796	Chr1:36099294-36099316	-	TGGGCAAGGCTGGTCCCCCAGGG
797	Chr1:36099295-36099317	-	ATGGGCAAGGCTGGTCCCCCAGG
798	Chr1:36099299-36099321	+	GGGGACCAGCCTTGCCCATCCGG
799	Chr1:36099300-36099322	+	GGGACCAGCCTTGCCCATCCGGG
800	Chr1:36099304-36099326	-	TTCTCCCGGATGGGCAAGGCTGG
801	Chr1:36099308-36099330	-	TGGCTTCTCCCGGATGGGCAAGG
802	Chr1:36099310-36099332	+	TTGCCCATCCGGGAGAAGCCAGG
803	Chr1:36099311-36099333	+	TGCCCATCCGGGAGAAGCCAGGG
804	Chr1:36099312-36099334	+	GCCCATCCGGGAGAAGCCAGGGG
805	Chr1:36099313-36099335	+	CCCATCCGGGAGAAGCCAGGGGG
806	Chr1:36099313-36099335	-	CCCCCTGGCTTCTCCCGGATGGG
807	Chr1:36099314-36099336	-	GCCCCCTGGCTTCTCCCGGATGG
808	Chr1:36099318-36099340	-	CTGGGCCCCCTGGCTTCTCCCGG
809	Chr1:36099322-36099344	+	GAGAAGCCAGGGGGCCAGCAGG
810	Chr1:36099323-36099345	+	AGAAGCCAGGGGGCCAGCAGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
811	Chr1:36099328-36099350	+	CCAGGGGGCCAGCAGGGCCAGG
812	Chr1:36099328-36099350	-	CCTGGCCCTGCTGGGCCCCCTGG
813	Chr1:36099336-36099358	-	ATGGGCAGCCTGGCCCTGCTGGG
814	Chr1:36099337-36099359	-	CATGGGCAGCCTGGCCCTGCTGG
815	Chr1:36099338-36099360	+	CAGCAGGGCCAGGCTGCCCATGG
816	Chr1:36099346-36099368	+	CCAGGCTGCCCATGGAGTCCTGG
817	Chr1:36099346-36099368	-	CCAGGACTCCATGGGCAGCCTGG
818	Chr1:36099354-36099376	-	TGGGAAAGCCAGGACTCCATGGG
819	Chr1:36099355-36099377	-	ATGGGAAAGCCAGGACTCCATGG
820	Chr1:36099361-36099383	+	AGTCCTGGCTTTCCCATGCCTGG
821	Chr1:36099364-36099386	-	AAACCAGGCATGGGAAAGCCAGG
822	Chr1:36099370-36099392	+	TTCCCATGCCTGGTTTCCTGG
823	Chr1:36099371-36099393	+	TTCCCATGCCTGGTTTCCTGGG
824	Chr1:36099373-36099395	-	TTCCAGGAAAACCAGGCATGGG
825	Chr1:36099374-36099396	-	CTTCCAGGAAAACCAGGCATGG
826	Chr1:36099379-36099401	+	CCTGGTTTTCTGGGAAGCCAGG
827	Chr1:36099379-36099401	-	CCTGGCTTCCAGGAAAACCAGG
828	Chr1:36099380-36099402	+	CTGGTTTTCTGGGAAGCCAGGG
829	Chr1:36099381-36099403	+	TGGTTTTCTGGGAAGCCAGGGG
830	Chr1:36099382-36099404	+	GGTTTTCTGGGAAGCCAGGGGG
831	Chr1:36099383-36099405	+	GTTTTCTGGGAAGCCAGGGGGG
832	Chr1:36099388-36099410	+	CCTGGGAAGCCAGGGGGGCCAGG
833	Chr1:36099388-36099410	-	CCTGGCCCCCTGGCTTCCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
834	Chr1:36099389-36099411	+	CTGGGAAGCCAGGGGGGCCAGGG
835	Chr1:36099390-36099412	+	TGGGAAGCCAGGGGGGCCAGGGG
836	Chr1:36099391-36099413	+	GGGAAGCCAGGGGGGCCAGGGGG
837	Chr1:36099397-36099419	-	CGGGGTCCCCCTGGCCCCCTGG
838	Chr1:36099400-36099422	+	GGGGGGCCAGGGGGAACCCGAGG
839	Chr1:36099405-36099427	+	GCCAGGGGGACCCCGAGGCCCGG
840	Chr1:36099406-36099428	+	CCAGGGGGACCCCGAGGCCCGGG
841	Chr1:36099406-36099428	-	CCCGGGCCTCGGGGTCCCCCTGG
842	Chr1:36099415-36099437	+	CCCCGAGGCCCGGGCTTCCCAGG
843	Chr1:36099415-36099437	-	CCTGGGAAGCCCGGGCCTCGGGG
844	Chr1:36099416-36099438	+	CCCGAGGCCCGGGCTTCCCAGGG
845	Chr1:36099416-36099438	-	CCCTGGGAAGCCCGGGCCTCGGG
846	Chr1:36099417-36099439	+	CCGAGGCCCGGGCTTCCCAGGGG
847	Chr1:36099417-36099439	-	CCCCTGGGAAGCCCGGGCCTCGG
848	Chr1:36099418-36099440	+	CGAGGCCCGGGCTTCCCAGGGGG
849	Chr1:36099419-36099441	+	GAGGCCCGGGCTTCCCAGGGGGG
850	Chr1:36099423-36099445	+	CCCGGGCTTCCCAGGGGGGGCCGG
851	Chr1:36099423-36099445	-	CCGGCCCCCTGGGAAGCCCGGG
852	Chr1:36099424-36099446	+	CCGGGCTTCCCAGGGGGGGCCGGG
853	Chr1:36099424-36099446	-	CCCGCCCCCTGGGAAGCCCGG
854	Chr1:36099432-36099454	-	AGGGAGAGCCCGGCCCCCTGGG
855	Chr1:36099433-36099455	-	AAGGGAGAGCCCGGCCCCCTGG
856	Chr1:36099437-36099459	+	GGGGGCCGGGCTCTCCCTTCAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
857	Chr1:36099442-36099464	-	ATGGACCTGAAGGGAGAGCCCGG
858	Chr1:36099445-36099467	+	GGCTCTCCCTTCAGGTCCATCGG
859	Chr1:36099451-36099473	-	CTGCTGCCGATGGACCTGAAGGG
860	Chr1:36099452-36099474	-	GCTGCTGCCGATGGACCTGAAGG
861	Chr1:36099454-36099476	+	TTCAGGTCCATCGGCAGCAGCGG
862	Chr1:36099460-36099482	+	TCCATCGGCAGCAGCGGTAGAGG
863	Chr1:36099461-36099483	-	GCCTCTACCGCTGCTGCCGATGG
864	Chr1:36099485-36099507	+	TTTCTGAGAAAAGAAAAGAAAAGG
865	Chr1:36099486-36099508	+	TTCTGAGAAAAGAAAAGAAAAGGG
866	Chr1:36099487-36099509	+	TCTGAGAAAAGAAAAGAAAAGGGG
867	Chr1:36099495-36099517	+	AGAAAAGAGAAAAGGGGCAGTCAGG
868	Chr1:36099496-36099518	+	GAAAAGAGAAAAGGGGCAGTCAGGG
869	Chr1:36099497-36099519	+	AAAGAGAAAAGGGGCAGTCAGGGG
870	Chr1:36099509-36099531	+	GCAGTCAGGGGCCTGAACTGTGG
871	Chr1:36099510-36099532	+	CAGTCAGGGGCCTGAACTGTGGG
872	Chr1:36099511-36099533	+	AGTCAGGGGCCTGAACTGTGGGG
873	Chr1:36099516-36099538	+	GGGGCCTGAACTGTGGGGACAGG
874	Chr1:36099517-36099539	+	GGGCCTGAACTGTGGGGACAGGG
875	Chr1:36099518-36099540	+	GGCCTGAACTGTGGGGACAGGGG
876	Chr1:36099520-36099542	-	GTCCCCTGTCCCCACAGTTCAGG
877	Chr1:36099542-36099564	-	AATGGGGGAATGGGTAGATGGGG
878	Chr1:36099543-36099565	-	GAATGGGGGAATGGGTAGATGGG
879	Chr1:36099544-36099566	-	GGAATGGGGGAATGGGTAGATGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 1】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
880	Chr1:36099551-36099573	-	TCATACTGGAATGGGGGAATGGG
881	Chr1:36099552-36099574	-	CTCATACTGGAATGGGGGAATGG
882	Chr1:36099553-36099575	+	CATTCCCCCATTCAGTATGAGG
883	Chr1:36099557-36099579	-	TGTACCTCATACTGGAATGGGGG
884	Chr1:36099558-36099580	-	GTGTACCTCATACTGGAATGGGG
885	Chr1:36099559-36099581	-	CGTGTACCTCATACTGGAATGGG
886	Chr1:36099560-36099582	+	CCATTCAGTATGAGGTACACGG
887	Chr1:36099560-36099582	-	CCGTGTACCTCATACTGGAATGG
888	Chr1:36099561-36099583	+	CATTCAGTATGAGGTACACGGG
889	Chr1:36099565-36099587	-	CTCTCCCGTGTACCTCATACTGG
890	Chr1:36099566-36099588	+	CAGTATGAGGTACACGGGAGAGG
891	Chr1:36099574-36099596	+	GGTACACGGGAGAGGAAGAATGG
892	Chr1:36099575-36099597	+	GTACACGGGAGAGGAAGAATGGG
893	Chr1:36099576-36099598	+	TACACGGGAGAGGAAGAATGGGG
894	Chr1:36099598-36099620	+	GCTGCCCCCTTCCTGCTCTCATGG
895	Chr1:36099602-36099624	-	TCTTCCATGAGAGCAGGAAGGGG
896	Chr1:36099603-36099625	-	ATCTTCCATGAGAGCAGGAAGGG
897	Chr1:36099604-36099626	-	CATCTTCCATGAGAGCAGGAAGG
898	Chr1:36099605-36099627	+	CTTCTGCTCTCATGGAAGATGG
899	Chr1:36099606-36099628	+	TTCTGCTCTCATGGAAGATGGG
900	Chr1:36099607-36099629	+	TCCTGCTCTCATGGAAGATGGGG
901	Chr1:36099608-36099630	-	ACCCCATCTTCCATGAGAGCAGG
902	Chr1:36099612-36099634	+	CTCTCATGGAAGATGGGGTTTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 2】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
903	Chr1:36099613-36099635	+	TCTCATGGAAGATGGGGTTTGGG
904	Chr1:36099614-36099636	+	CTCATGGAAGATGGGGTTTGGGG
905	Chr1:36099615-36099637	+	TCATGGAAGATGGGGTTTGGGGG
906	Chr1:36099618-36099640	+	TGGAAGATGGGGTTTGGGGGTGG
907	Chr1:36099624-36099646	+	ATGGGGTTTGGGGGTGGCCCAGG
908	Chr1:36099625-36099647	+	TGGGGTTTGGGGGTGGCCCAGGG
909	Chr1:36099626-36099648	+	GGGGTTTGGGGGTGGCCCAGGGG
910	Chr1:36099635-36099657	+	GGGTGGCCCAGGGGACATCTTGG
911	Chr1:36099636-36099658	+	GGTGGCCCAGGGGACATCTTGGG
912	Chr1:36099637-36099659	+	GTGGCCCAGGGGACATCTTGGGG
913	Chr1:36099638-36099660	+	TGGCCCAGGGGACATCTTGGGGG
914	Chr1:36099641-36099663	-	TTGCCCCCAAGATGTCCCCTGGG
915	Chr1:36099642-36099664	-	GTTGCCCCCAAGATGTCCCCTGG
916	Chr1:36099645-36099667	+	GGGGACATCTTGGGGGCAACAGG
917	Chr1:36099646-36099668	+	GGGACATCTTGGGGGCAACAGGG
918	Chr1:36099660-36099682	+	GCAACAGGGTGTCTCCTTAAGG
919	Chr1:36099661-36099683	+	CAACAGGGTGTCTCCTTAAGGG
920	Chr1:36099672-36099694	-	GGTGTTAGGAGCCCTTAAGGAGG
921	Chr1:36099675-36099697	-	TTGGGTGTTAGGAGCCCTTAAGG
922	Chr1:36099685-36099707	+	TCCTAACACCCAACCTACCTAGG
923	Chr1:36099686-36099708	-	GCCTAGGTAGGTTGGGTGTTAGG
924	Chr1:36099689-36099711	+	AACACCCAACCTACCTAGGCTGG
925	Chr1:36099690-36099712	+	ACACCCAACCTACCTAGGCTGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 3】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
926	Chr1:36099693-36099715	-	AGGCCCAGCCTAGGTAGGTTGGG
927	Chr1:36099694-36099716	-	GAGGCCCAGCCTAGGTAGGTTGG
928	Chr1:36099698-36099720	-	GGAGGAGGCCCAGCCTAGGTAGG
929	Chr1:36099702-36099724	-	TCATGGAGGAGGCCCAGCCTAGG
930	Chr1:36099708-36099730	+	CTGGGCCTCCTCCATGAGCCTGG
931	Chr1:36099713-36099735	-	ATCAGCCAGGCTCATGGAGGAGG
932	Chr1:36099716-36099738	-	AGAATCAGCCAGGCTCATGGAGG
933	Chr1:36099719-36099741	-	GTGAGAATCAGCCAGGCTCATGG
934	Chr1:36099726-36099748	-	ATGAGAGGTGAGAATCAGCCAGG
935	Chr1:36099741-36099763	-	TCAGGTCATGCAGGGATGAGAGG
936	Chr1:36099744-36099766	+	CTCATCCCTGCATGACCTGAAGG
937	Chr1:36099747-36099769	+	ATCCCTGCATGACCTGAAGGTGG
938	Chr1:36099749-36099771	-	CTCCACCTTCAGGTCATGCAGGG
939	Chr1:36099750-36099772	-	ACTCCACCTTCAGGTCATGCAGG
940	Chr1:36099752-36099774	+	TGCATGACCTGAAGGTGGAGTGG
941	Chr1:36099759-36099781	-	CTGGTGGCCACTCCACCTTCAGG
942	Chr1:36099760-36099782	+	CTGAAGGTGGAGTGGCCACCAGG
943	Chr1:36099763-36099785	+	AAGGTGGAGTGGCCACCAGGTGG
944	Chr1:36099775-36099797	-	GGGCTGCTGGTGGCCACCTGGTGG
945	Chr1:36099778-36099800	-	GGTGGGCTGCTGGTGGCCACCTGG
946	Chr1:36099788-36099810	-	CGGGCTCTAAGGTGGGCTGCTGG
947	Chr1:36099791-36099813	+	GCAGCCCACCTTAGAGCCCGTGG
948	Chr1:36099792-36099814	+	CAGCCCACCTTAGAGCCCGTGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 4】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
949	Chr1:36099795-36099817	-	GCTCCACGGGCTCTAAGGTGGG
950	Chr1:36099796-36099818	-	TGCTCCACGGGCTCTAAGGTGG
951	Chr1:36099799-36099821	-	CTCTGCTCCACGGGCTCTAAGG
952	Chr1:36099807-36099829	-	AGGTGGGGCTCTGCTCCACGGG
953	Chr1:36099808-36099830	-	GAGGTGGGGCTCTGCTCCACGG
954	Chr1:36099822-36099844	-	AACTGGGAAGTTGGGAGGTGGG
955	Chr1:36099823-36099845	-	GAACTGGGAAGTTGGGAGGTGGG
956	Chr1:36099824-36099846	-	TGAACTGGGAAGTTGGGAGGTGG
957	Chr1:36099827-36099849	-	AGATGAACTGGGAAGTTGGGAGG
958	Chr1:36099830-36099852	-	GGGAGATGAACTGGGAAGTTGGG
959	Chr1:36099831-36099853	-	GGGGAGATGAACTGGGAAGTTGG
960	Chr1:36099836-36099858	+	TTCCCAGTTCATCTCCCCCTTGG
961	Chr1:36099838-36099860	-	TTCCAAGGGGGAGATGAACTGGG
962	Chr1:36099839-36099861	-	CTTCCAAGGGGGAGATGAACTGG
963	Chr1:36099850-36099872	-	GCACAGGTGGTCTTCCAAGGGGG
964	Chr1:36099851-36099873	-	GGCACAGGTGGTCTTCCAAGGGG
965	Chr1:36099852-36099874	-	TGGCACAGGTGGTCTTCCAAGGG
966	Chr1:36099853-36099875	-	CTGGCACAGGTGGTCTTCCAAGG
967	Chr1:36099863-36099885	-	GTGCAGTTAGCTGGCACAGGTGG
968	Chr1:36099866-36099888	-	ACGGTGCAGTTAGCTGGCACAGG
969	Chr1:36099872-36099894	-	CTGGAAACGGTGCAGTTAGCTGG
970	Chr1:36099873-36099895	+	CAGCTAACTGCACCGTTTCCAGG
971	Chr1:36099881-36099903	+	TGCACCGTTTCCAGGCCCTCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 5】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
972	Chr1:36099882-36099904	+	GCACCGTTTCCAGGCCCTCTGGG
973	Chr1:36099883-36099905	+	CACCGTTTCCAGGCCCTCTGGGG
974	Chr1:36099885-36099907	-	TACCCAGAGGGCCTGGAAACGG
975	Chr1:36099890-36099912	+	TCCAGGCCCTCTGGGGTATTAGG
976	Chr1:36099891-36099913	-	TCCTAATACCCAGAGGGCCTGG
977	Chr1:36099896-36099918	-	GTTTTTCCTAATACCCAGAGGG
978	Chr1:36099897-36099919	-	TGTTTTTCCTAATACCCAGAGG
979	Chr1:36099904-36099926	+	GGTATTAGGAAAAACACTGAAGG
980	Chr1:36099908-36099930	+	TTAGGAAAAACACTGAAGGTAGG
981	Chr1:36099916-36099938	+	AACACTGAAGGTAGGAAAATTGG
982	Chr1:36099919-36099941	+	ACTGAAGGTAGGAAAATTGGTGG
983	Chr1:36099920-36099942	+	CTGAAGGTAGGAAAATTGGTGGG
984	Chr1:36099921-36099943	+	TGAAGGTAGGAAAATTGGTGGGG
985	Chr1:36099928-36099950	+	AGGAAAATTGGTGGGGAATGAGG
986	Chr1:36099936-36099958	+	TGGTGGGGAATGAGGAGCTCTGG
987	Chr1:36099939-36099961	+	TGGGGAATGAGGAGCTGTGGAGG
988	Chr1:36099940-36099962	+	GGGGAATGAGGAGCTGTGGAGGG
989	Chr1:36099949-36099971	+	GGAGCTGTGGAGGGCGCCTGAGG
990	Chr1:36099958-36099980	+	GAGGGCGCCTGAGGATCTGATGG
991	Chr1:36099965-36099987	-	CTGAGAGCCATCAGATCCTCAGG
992	Chr1:36099966-36099988	+	CTGAGGATCTGATGGCTCTCAGG
993	Chr1:36099967-36099989	+	TGAGGATCTGATGGCTCTCAGGG
994	Chr1:36099970-36099992	+	GGATCTGATGGCTCTCAGGGAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 6】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
995	Chr1:36099974-36099996	+	CTGATGGCTCTCAGGGAGGCAGG
996	Chr1:36099975-36099997	+	TGATGGCTCTCAGGGAGGCAGGG
997	Chr1:36099976-36099998	+	GATGGCTCTCAGGGAGGCAGGGG
998	Chr1:36099982-36100004	+	TCTCAGGGAGGCAGGGGATTGG
999	Chr1:36099983-36100005	+	CTCAGGGAGGCAGGGGATTGGG
1000	Chr1:36099984-36100006	+	TCAGGGAGGCAGGGGATTGGGG
1001	Chr1:36099985-36100007	+	CAGGGAGGCAGGGGATTGGGGG
1002	Chr1:36099989-36100011	+	GAGGCAGGGGATTGGGGGCTGG
1003	Chr1:36099990-36100012	+	AGGCAGGGGATTGGGGGCTGGG
1004	Chr1:36100002-36100024	+	TGGGGGCTGGGAGCGATTGAGG
1005	Chr1:36100010-36100032	+	GGGAGCGATTGAGGCACTGTGG
1006	Chr1:36100011-36100033	+	GGAGCGATTGAGGCACTGTGGG
1007	Chr1:36100012-36100034	+	GAGCGATTGAGGCACTGTGGGG
1008	Chr1:36100017-36100039	+	ATTTGAGGCACTGTGGGGTGAGG
1009	Chr1:36100020-36100042	+	TGAGGCACTGTGGGGTGAGGAGG
1010	Chr1:36100032-36100054	+	GGGTGAGGAGGCTCTACCCAGG
1011	Chr1:36100038-36100060	+	GGAGGCTCTACCCAGGTACTGG
1012	Chr1:36100049-36100071	-	GAGGGCAAAGGCCAGTACCTGGG
1013	Chr1:36100050-36100072	-	TGAGGGCAAAGGCCAGTACCTGG
1014	Chr1:36100053-36100075	+	GGTACTGGCCTTTGCCCTCACGG
1015	Chr1:36100057-36100079	+	CTGGCCTTTGCCCTCACGGAAGG
1016	Chr1:36100058-36100080	+	TGGCCTTTGCCCTCACGGAAGGG
1017	Chr1:36100061-36100083	+	CCTTTGCCCTCACGGAAGGGCGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 7】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
1018	Chr1:36100061-36100083	-	CCGCCCTTCCGTGAGGGCAAAGG
1019	Chr1:36100067-36100089	-	GTGGGACCGCCCTTCCGTGAGGG
1020	Chr1:36100068-36100090	-	TGTGGGACCGCCCTTCCGTGAGG
1021	Chr1:36100070-36100092	+	TCACGGAAGGGCGGTCCCACAGG
1022	Chr1:36100084-36100106	+	TCCCACAGGTCTTTTCTGCATGG
1023	Chr1:36100085-36100107	+	CCCACAGGTCCTTTTCTGCATGGG
1024	Chr1:36100085-36100107	-	CCCATGCAGAAAGGACCTGTGGG
1025	Chr1:36100086-36100108	-	GCCCATGCAGAAAGGACCTGTGG
1026	Chr1:36100089-36100111	+	CAGGTCCTTTTCTGCATGGGCTGG
1027	Chr1:36100094-36100116	-	TACATCCAGCCCATGCAGAAAGG
1028	Chr1:36100103-36100125	+	ATGGGCTGGATGTACTTCACTGG
1029	Chr1:36100104-36100126	+	TGGGCTGGATGTACTTCACTGGG
1030	Chr1:36100105-36100127	+	GGGCTGGATGTACTTCACTGGGG
1031	Chr1:36100126-36100148	+	GGCATAGCCCCGCCGCCACCGG
1032	Chr1:36100133-36100155	-	GGCGGGGCCGGTGGGGCGGCGGG
1033	Chr1:36100134-36100156	-	TGGCGGGGCCGGTGGGGCGGCGG
1034	Chr1:36100137-36100159	-	TGGTGGCGGGGCCGGTGGGGCGG
1035	Chr1:36100140-36100162	-	CTCTGGTGGCGGGGCCGGTGGGG
1036	Chr1:36100141-36100163	+	CCCACCGGCCCGCCACCAGAGG
1037	Chr1:36100141-36100163	-	CCTCTGGTGGCGGGGCCGGTGGG
1038	Chr1:36100142-36100164	-	TCCTCTGGTGGCGGGGCCGGTGG
1039	Chr1:36100145-36100167	-	GCGTCCTCTGGTGGCGGGGCCGG
1040	Chr1:36100149-36100171	-	GCGGGCGTCCTCTGGTGGCGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 8】

配列番号	染色体の位置	鎖	標的配列
1041	Chr1:36100150-36100172	-	CGCGGGCGTCCTCTGGTGGCGGG
1042	Chr1:36100151-36100173	+	CCGCCACCAGAGGACGCCCGCGG
1043	Chr1:36100151-36100173	-	CCGCGGGCGTCCTCTGGTGGCGG
1044	Chr1:36100154-36100176	-	GGGCCGCGGGCGTCCTCTGGTGG
1045	Chr1:36100157-36100179	-	TGTGGGCCCGCGGGCGTCCTCTGG
1046	Chr1:36100167-36100189	-	GGTGCTGGGGTGTGGGCCGCGGG
1047	Chr1:36100168-36100190	-	TGGTGCTGGGGTGTGGGCCGCGG
1048	Chr1:36100174-36100196	-	TGGTGCTGGTGCTGGGGTGTGGG
1049	Chr1:36100175-36100197	-	CTGGTGCTGGTGCTGGGGTGTGG
1050	Chr1:36100180-36100202	-	TGCTACTGGTGCTGGTGCTGGGG
1051	Chr1:36100181-36100203	-	CTGCTACTGGTGCTGGTGCTGGG
1052	Chr1:36100182-36100204	-	GCTGCTACTGCTACTGGTGCTGG
1053	Chr1:36100188-36100210	-	GCTGCTGCTGCTACTGGTGCTGG
1054	Chr1:36100194-36100216	-	TTCGCTGCTGCTGCTGCTACTGG
1055	Chr1:36100200-36100222	+	GCAGCAGCAGCAGCGAAGACAGG
1056	Chr1:36100201-36100223	+	CAGCAGCAGCAGCGAAGACAGGG
1057	Chr1:36100202-36100224	+	AGCAGCAGCAGCGAAGACAGGGG
1058	Chr1:36100222-36100244	+	GGGTGTCAGAGTCCCCAGCATGG
1059	Chr1:36100231-36100253	+	AGTCCCCAGCATGGCGTCCGTGG
1060	Chr1:36100234-36100256	-	CGTCCACGGACGCCATGCTGGGG
1061	Chr1:36100235-36100257	-	ACGTCCACGGACGCCATGCTGGG
1062	Chr1:36100236-36100258	-	CACGTCCACGGACGCCATGCTGG
1063	Chr1:36100248-36100270	-	TCTTCTTTGCAGCACGTCCACGG

10

20

30

40

50

【表 7】

表 4. G l n 4 5 5 L y s 変異を持つ C O L 8 A 2 の標的配列

配列番号	標的の位置	標的鎖	標的配列
1064	Chr1:36098302 -36098324	+	CCCCTCAGGCCAGGCTTCCCAGG
1065	Chr1:36098302 -36098324	-	CCTGGGAAGCCTGGCCTGAGGGG
1066	Chr1:36098303 -36098325	+	CCCTCAGGCCAGGTTGCCCAGGG
1067	Chr1:36098303 -36098325	-	CCCTGGGAAGCCTGGCCTGAGGG
1068	Chr1:36098304 -36098326	-	TCCCTGGGAAGCCTGGCCTGAGG
1069	Chr1:36098311 -36098333	-	TTGGGGCTCCCTGGGAAGCCTGG

10

【表 8】

表 5. G l n 4 5 5 V a l 変異を持つ C O L 8 A 2 の標的配列

配列番号	標的の位置	標的鎖	標的配列
1070	Chr1:36098302- 36098324	+	CCCCTCAGGCCAGGCACCCCAGG
1071	Chr1:36098302- 36098324	-	CCTGGGGTGCCTGGCCTGAGGGG
1072	Chr1:36098303- 36098325	+	CCCTCAGGCCAGGCACCCCAGGG
1073	Chr1:36098303- 36098325	-	CCCTGGGGTGCCTGGCCTGAGGG
1074	Chr1:36098304- 36098326	-	TCCCTGGGGTGCCTGGCCTGAGG
1075	Chr1:36098311- 36098333	-	TTGGGGCTCCCTGGGGTGCCTGG

20

30

40

50

【表 9 - 1】

表 6. L e u 4 5 0 T r p 変異を持つ C O L 8 A 2 の標的配列

配列番号	標的の位置	標的鎖	標的配列
1076	Chr1:36098311-36098333	-	TGGGGGCTCCCTGGGCAGCCTGG
1077	Chr1:36098319-36098341	-	AAGGTGACTGGGGGCTCCCTGGG
1078	Chr1:36098320-36098342	-	AAAGGTGACTGGGGGCTCCCTGG

10

【表 9 - 2】

配列番号	標的の位置	標的鎖	標的配列
1079	Chr1:36098328-36098350	-	TGGGGCAGAAAGGTGACTGGGGG
1080	Chr1:36098329-36098351	-	CTGGGGCAGAAAGGTGACTGGGG
1081	Chr1:36098330-36098352	+	CCCAGTCACCTTTCTGCCCCAGG
1082	Chr1:36098330-36098352	-	CCTGGGGCAGAAAGGTGACTGGG
1083	Chr1:36098331-36098353	+	CCAGTCACCTTTCTGCCCCAGGG
1084	Chr1:36098331-36098353	-	CCCTGGGGCAGAAAGGTGACTGG

20

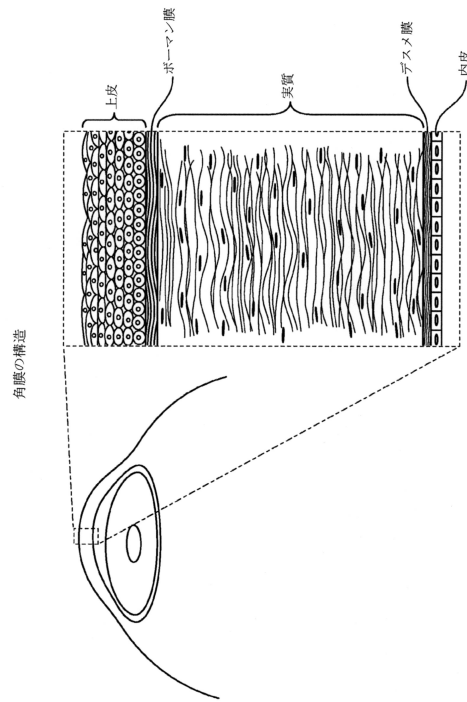
30

40

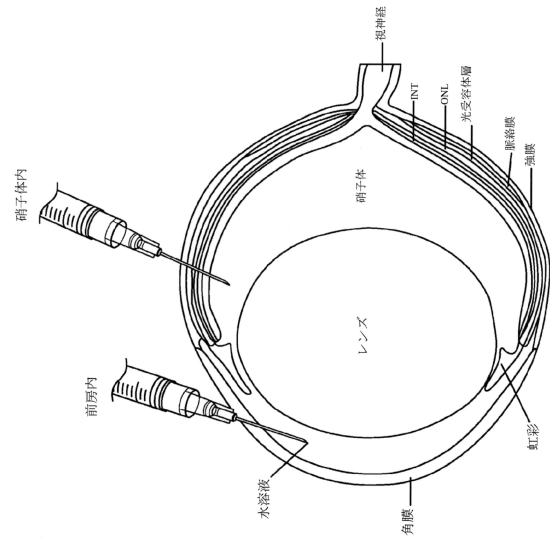
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

【図 3】

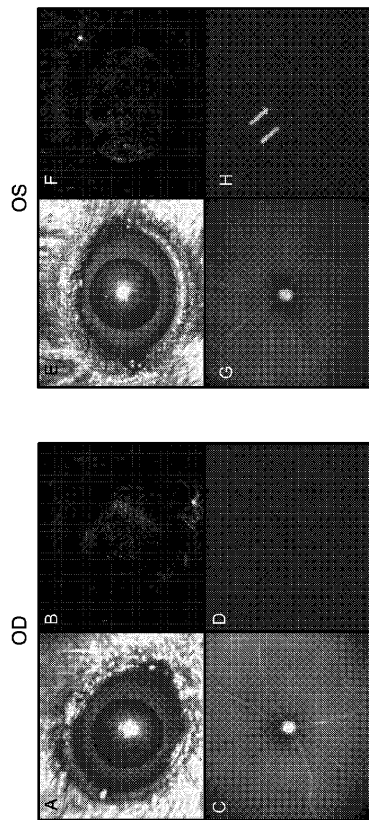
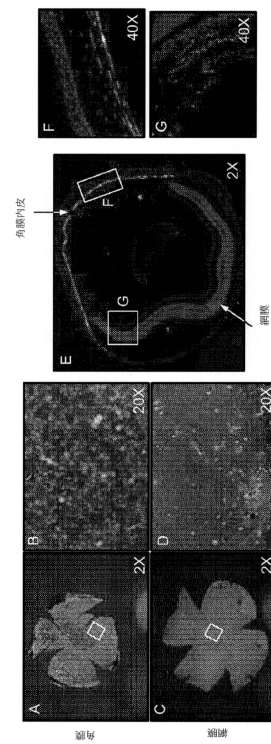


FIG. 3

【図 4】

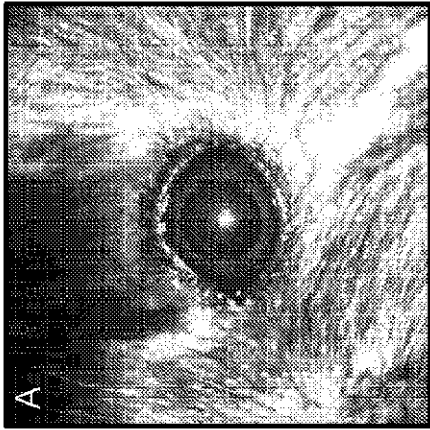


30

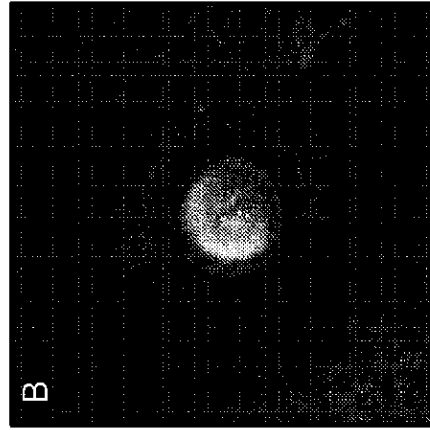
40

50

【図 5 A】

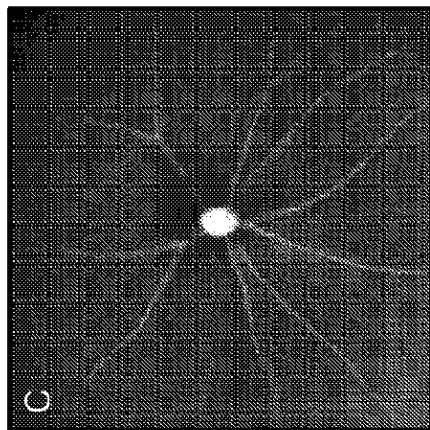


【図 5 B】

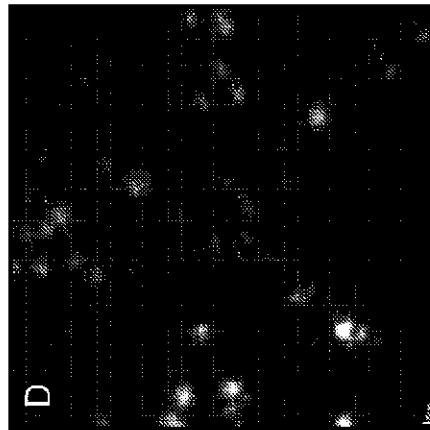


10

【図 5 C】



【図 5 D】



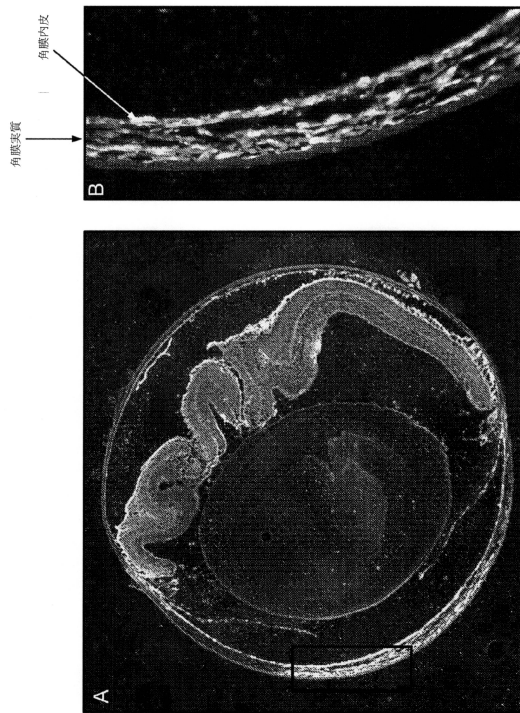
20

30

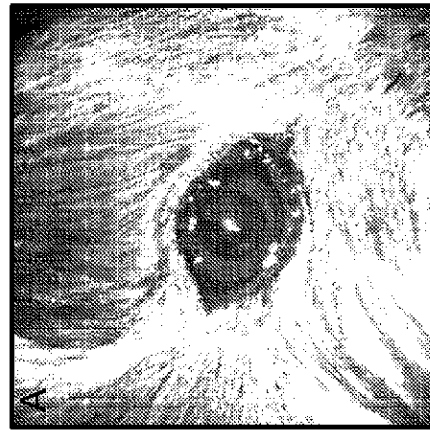
40

50

【図 6】



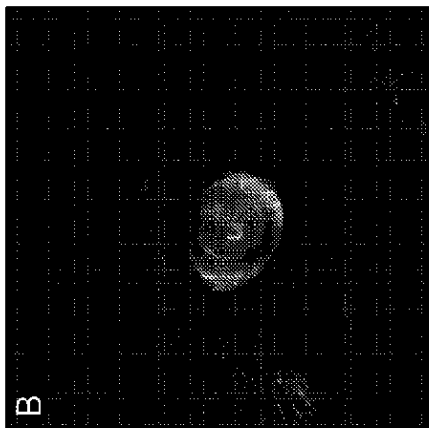
【図 7 A】



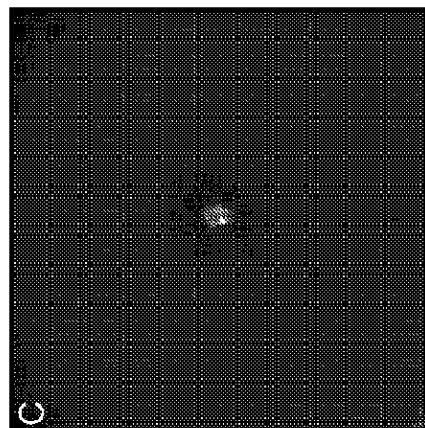
10

20

【図 7 B】



【図 7 C】

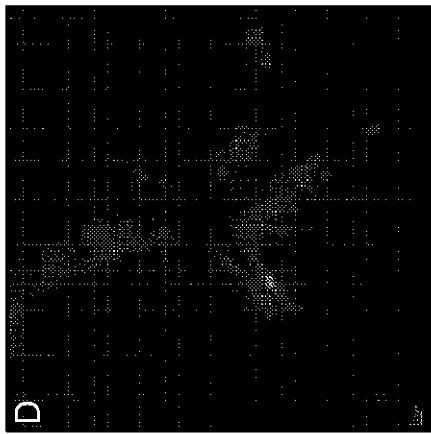


30

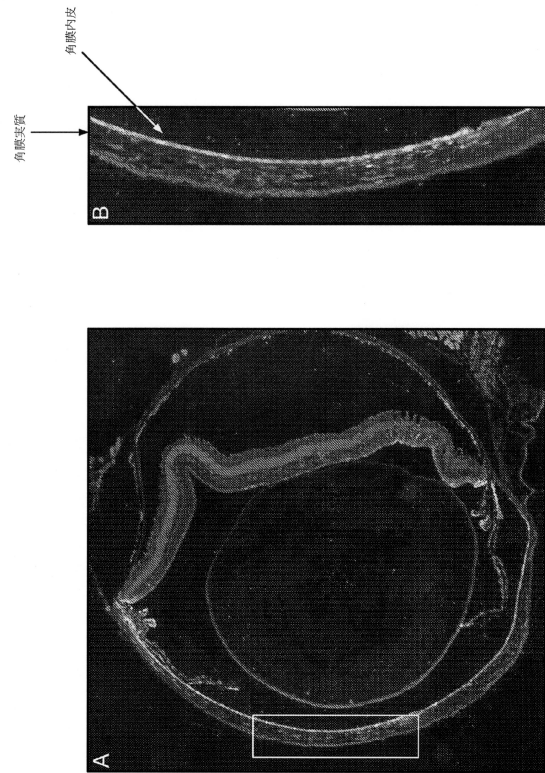
40

50

【図 7 D】



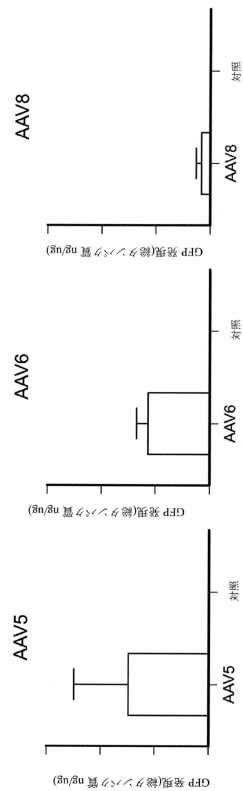
【図 8】



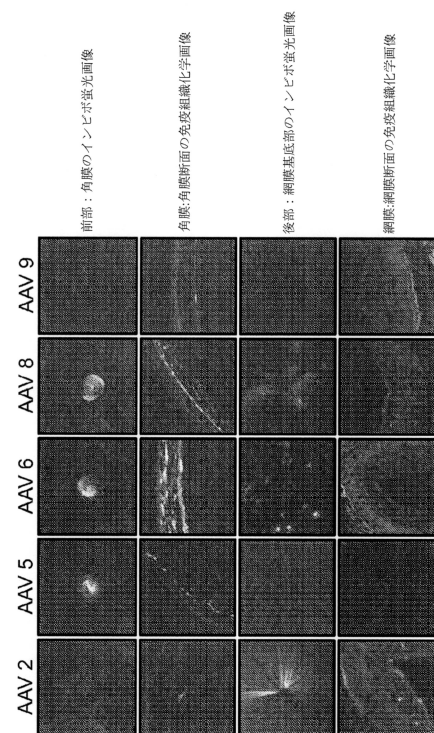
10

20

【図 9】



【図 10】



30

40

50

【配列表】

2022522756000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/020134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K9/51 A61P27/02 C12N15/10 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P C40B C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/185054 A1 (INTELLIA THERAPEUTICS INC [US]) 26 October 2017 (2017-10-26) cited in the application The query sequence SEQ ID NO:1 has 100.00 % identity (100.00 % similarity) over 23 positions in a common overlap (range (q:s): 1-23:1-23) with subject GSN:BEN20232 (length: 23) from WO2017185054-A1 published on 2017-10-26. The query sequence SEQ ID NO:2 has 100.00 % identity (100.00 % similarity) over 23 positions in a common overlap (range (q:s): 1-23:1-23) with subject GSN:BEN20233 (length: 23) from WO2017185054-A1 published on 2017-10-26.; paragraphs [0002] - [0012], [0178]; claims 1-79; tables 1-5 ----- -/--	1-37, 71-168
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 July 2020		Date of mailing of the international search report 15/07/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Seranski, Peter

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/020134

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/165541 A1 (UNIV TEXAS [US]; UNIV OF MASSACHUSETTS MEDICAL SCHOOL [US]) 13 September 2018 (2018-09-13) page 54 - page 56; claims 1-266; examples 1-7	1-168
X	----- WO 2019/025984 A1 (REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LTD [CN]) 7 February 2019 (2019-02-07) claims 1-334	1-168
X	----- COURTNEY DG ET AL: "A Review of Personalised Molecular Medicine for the Treatment of Corneal Disorders", INTERNATIONAL JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY & EYE SCIENCE, 27 August 2015 (2015-08-27), pages 7-18, XP055262988, DOI: 10.19070/2332-290X-SI02002 page 7 - page 18 -----	1-168

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/020134

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017185054 A1	26-10-2017	AU 2017254718 A1 BR 112018071439 A2 CA 3021647 A1 CN 109414450 A CO 2018012433 A2 EP 3445375 A1 JP 2019515914 A KR 20180134412 A US 2019142972 A1 WO 2017185054 A1	15-11-2018 19-03-2019 26-10-2017 01-03-2019 30-04-2019 27-02-2019 13-06-2019 18-12-2018 16-05-2019 26-10-2017
WO 2018165541 A1	13-09-2018	EP 3592365 A1 WO 2018165541 A1	15-01-2020 13-09-2018
WO 2019025984 A1	07-02-2019	AU 2018311504 A1 CA 3071769 A1 EP 3662066 A1 KR 20200036912 A SG 11202000840Y A TW 201920679 A WO 2019025984 A1	12-03-2020 07-02-2019 10-06-2020 07-04-2020 27-02-2020 01-06-2019 07-02-2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 38/17 (2006.01)
 C 1 2 N 15/864 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/113 (2010.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 A 0 1 K 67/027 (2006.01)
 C 1 2 N 7/01 (2006.01)

F I

A 6 1 K 38/17
 C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/113 Z
 C 1 2 N 15/09 1 1 0
 C 1 2 N 15/09 1 0 0
 A 0 1 K 67/027
 C 1 2 N 7/01

テーマコード (参考)

(32)優先日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 0 5 9 1-6 7 0 7・タリータウン・オールド・ソウ・ミル・リバー・ロード・7 7 7・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 カメロ・ロマーノ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・1 0 5 9 1-6 7 0 7・タリータウン・オールド・ソウ・ミル・リバー・ロード・7 7 7・リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA95X AB01 AC14 BA01 CA23 CA24 CA27 CA44
 4C084 AA13 BA44 CA53 DA40 DC22 DC50 MA66 NA14 ZA33
 4C087 AA01 AA02 BC83 MA66 NA14 ZA33