(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-546597
(P2023-546597A)
(43)公表日　令和5年11月6日(2023.11.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*9/22 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/22		
Ｃ１２Ｎ	*9/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/10		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全169頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-524355(P2023-524355)
(86)(22)出願日　令和3年10月21日(2021.10.21)
(85)翻訳文提出日　令和5年6月19日(2023.6.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/056006
(87)国際公開番号　WO2022/087235
(87)国際公開日　令和4年4月28日(2022.4.28)
(31)優先権主張番号　63/094,803
(32)優先日　令和2年10月21日(2020.10.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/222,550
(32)優先日　令和3年7月16日(2021.7.16)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　596060697
マサチューセッツ インスティテュート オブ テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　アブディエ，オマー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・０２１４１、ケンブリッジ、ブリストル・ストリート・４９
(72)発明者　グーテンバーグ，ジョナサン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・０２１４２、ケンブリッジ、サード・スト
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用した部位特異的遺伝子操作のためのシステム、方法及び組成物

(57)【要約】
本開示は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用した部位特異的遺伝子操作のためのシステム、方法及び組成物を提供する。ＰＡＳＴＥは、標的ゲノム内への組込み部位の付加、それに続くその部位での目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列の挿入を含む。ＰＡＳＴＥは、疾患の処置及び疾患の診断のためにゲノム内への遺伝子の一方向組入れを達成するために遺伝子編集技術及びインテグラーゼ技術を組み合わせる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞ゲノム内への核酸の部位特異的組込み方法であって、
（ａ）細胞内に
ｉ．逆転写酵素ドメインに連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼであって、ニッカーゼ活性を含む、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼ、及び
ｉｉ．組込み配列に連結しているプライマー結合配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用し、細胞ゲノム内の所望の位置を標的とし、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、細胞ゲノムの鎖をニッキングし、逆転写酵素ドメインが、ｇＲＮＡの組込み配列をニッキング部位に組入れ、それによって細胞ゲノムの所望の位置に組込み部位を得る、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）
を導入することによって細胞ゲノム内の所望の位置に組込み部位を組入れるステップ、並びに
（ｂ）細胞内に
ｉ．組込み部位に相補的である又は関連する配列に連結している核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖、及び
ｉｉ．組込み酵素であって、組込み部位に相補的である又は関連する配列の組込み、組換え又は逆転写によって組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れ、それによって細胞の細胞ゲノムの所望の位置に核酸を導入する、組込み酵素
を導入することによって細胞ゲノム内に核酸を組み込むステップ
を含む、方法。
【請求項２】
ｇＲＮＡが、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼによってニッキングされるゲノム鎖に対する細胞ゲノムの相補鎖とハイブリダイズする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
組込み酵素が、ペプチド又は組込み酵素をコードする核酸として導入される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、ペプチド又はＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸として導入される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖が、ミニサークル、プラスミド、ｍＲＮＡ又は直鎖ＤＮＡとして細胞内に導入される、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖が、１０００ｂｐ～３６，０００ｂｐである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖が、３６，０００ｂｐ超である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖が、１０００ｂｐ未満である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
核酸を含むＤＮＡが、ミニサークルとして細胞内に導入される、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
ミニサークルが、細菌起源の配列を含まない、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
逆転写酵素ドメイン及び組込み酵素に連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、リンカーを介して連結している、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】
リンカーが、切断可能である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
リンカーが、切断可能ではない、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
リンカーが、逆転写酵素に連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼの２つの関連する結合ドメインに置き換えられ得る、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
組込み酵素が、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択される、請求項１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
組込み酵素が、Ｂｘｂ１又はその変異体である、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
組込み部位が、ａｔｔＢ部位、ａｔｔＰ部位、ａｔｔＬ部位、ａｔｔＲ部位、ｌｏｘ７１部位、Ｖｏｘ部位又はＦＲＴ部位である、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂニッカーゼから選択される、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
逆転写酵素ドメインが、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素ドメイン、転写ゼノポリメラーゼ（ＲＴＸ）、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ＡＭＶ－ＲＴ）及びユウバクテリウム・レクターレマチュラーゼＲＴ（ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ）からなる群から選択される、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
逆転写酵素ドメインが、野生型配列に対する変異を含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインが、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される１つ以上の変異を含む、請求項１９に記載の方法。
【請求項２２】
第２のニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）を導入するステップをさらに含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
ｇＲＮＡ、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸、逆転写酵素、相補的又は関連する組込み部位に連結している核酸を含むＤＮＡ、組込み酵素及び任意選択的にｎｇＲＮＡが、単一反応において細胞内に導入される、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法

。
【請求項２４】
ｇＲＮＡ、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸、逆転写酵素、相補的組込み部位に連結している核酸を含むＤＮＡ、組込み酵素及び任意選択的にｎｇＲＮＡが、ウイルス、ＲＮＰ、ｍＲＮＡ、脂質又はポリマーナノ粒子を使用して導入される、請求項１～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
核酸が、レポーター遺伝子である、請求項１～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
レポーター遺伝子が、蛍光タンパク質である、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
細胞が、分裂細胞である、請求項１～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８】
細胞が、非分裂細胞である、請求項１～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
細胞ゲノム内の所望の位置が、変異遺伝子の遺伝子座である、請求項１～２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
核酸が、小分子の存在下でのタンパク質のプログラム可能なノックダウンのための分解タグである、請求項１に記載の方法。
【請求項３１】
細胞が、哺乳動物細胞、細菌細胞又は植物細胞である、請求項１に記載の方法。
【請求項３２】
核酸が、Ｔ細胞又はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞内への組込みのための、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、インターロイキン、サイトカイン又は免疫チェックポイント遺伝子である、請求項１に記載の方法。
【請求項３３】
ＴＣＲ、ＣＡＲ、インターロイキン、サイトカイン又は免疫チェックポイント遺伝子が、ミニサークルＤＮＡを使用してＴ細胞又はＮＫ細胞ゲノムの標的部位内に組入れられる、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
核酸が、ベータヘモグロビン（ＨＢＢ）遺伝子であり、細胞が、造血幹細胞（ＨＳＣ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項３５】
ＨＢＢ遺伝子が、ミニサークルＤＮＡを使用してＨＳＣゲノム内の標的部位内に組入れられる、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
核酸が、ベータサラセミア又は鎌状赤血球貧血の原因となる遺伝子である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
核酸が、代謝遺伝子である、請求項１に記載の方法。
【請求項３８】
代謝遺伝子が、アルファ－１アンチトリプシン欠損症又はオルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）欠損症に関与している、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
代謝遺伝子が、遺伝性疾患に関与している遺伝子である、請求項３７又は３８に記載の方法。
【請求項４０】
核酸が、遺伝性疾患又は遺伝性症候群に関与している遺伝子である、請求項１に記載の方法。

【請求項４１】
遺伝性疾患が、嚢胞性線維症、家族性高コレステロール血症、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症、Ｘ連鎖ＳＣＩＤ（Ｘ－ＳＣＩＤ）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、ヘモクロマトーシス、テイ・サックス病、脆弱Ｘ症候群、ハンチントン病、マルファン症候群、フェニルケトン尿症又は筋ジストロフィーである、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含む、ベクター。
【請求項４３】
リンカーが、切断可能である、請求項４２に記載のベクター。
【請求項４４】
リンカーが、切断可能ではない、請求項４２に記載のベクター。
【請求項４５】
リンカーが、逆転写酵素に連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼの２つの関連する結合ドメインを含む、請求項４２に記載のベクター。
【請求項４６】
組込み酵素が、条件付き活性化ドメイン又は条件付き発現ドメインを含む、請求項４２に記載のベクター。
【請求項４７】
組込み酵素が、エストロゲン受容体に融合している、請求項４６に記載のベクター。
【請求項４８】
ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択される、請求項４２に記載のベクター。
【請求項４９】
逆転写酵素が、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素、ＡＭＶ－ＲＴ、ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ又はＲＴＸである、請求項４２に記載のベクター。
【請求項５０】
逆転写酵素が、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素に対して修飾されたＭ－ＭＬＶ逆転写酵素である、請求項４９に記載のベクター。
【請求項５１】
Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインが、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される変異のうちの１つ以上を含む、請求項４９に記載のベクター。
【請求項５２】
組込み酵素が、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ及びＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）、Ｍｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの変異体からなる群から選択される、請求項４２に記載のベクター。
【請求項５３】
リコンビナーゼ又はインテグラーゼが、Ｂｘｂ１又はその変異体である、請求項５２に記載のベクター。

【請求項５４】
（ａ）リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクター、
（ｂ）プライマー結合配列、組込み配列及びガイド配列を含むｇＲＮＡであって、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる、ｇＲＮＡ、
（ｃ）核酸及びコードされたインテグラーゼ、リコンビナーゼ又は逆転写酵素によって認識される配列を含むＤＮＡミニサークル、並びに
（ｄ）ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡを含む、細胞。
【請求項５５】
ミニサークルが、細菌起源の配列を含まない、請求項５４に記載の細胞。
【請求項５６】
組込み酵素が、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ及びＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）、Ｍｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択される、請求項５４に記載の細胞。
【請求項５７】
組込み酵素が、Ｂｘｂ１又はその変異体である、請求項５４に記載の細胞。
【請求項５８】
ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａからなる群から選択される、請求項５４に記載の細胞。
【請求項５９】
逆転写酵素が、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素である、請求項５４に記載の細胞。
【請求項６０】
逆転写酵素が、修飾されたＭ－ＭＬＶ逆転写酵素である、請求項５９に記載の細胞。
【請求項６１】
Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素のアミノ酸配列が、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される１つ以上の変異を含む、請求項５９に記載の細胞。
【請求項６２】
ｎｇＲＮＡをさらに含む、請求項５４～６１のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項６３】
リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼを含む、ポリペプチド。
【請求項６４】
リンカーが、切断可能である、請求項６３に記載のポリペプチド。
【請求項６５】
リンカーが、切断可能ではない、請求項６３に記載のポリペプチド。
【請求項６６】
組込み酵素が、エストロゲン受容体に融合している、請求項６３に記載のポリペプチド。
【請求項６７】

ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂ／ｃ／ｄ／ｅ／ｆ／ｇ／ｈ／ｉ／ｊからなる群から選択される、請求項６３に記載のポリペプチド。

【請求項６８】

逆転写酵素が、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素、ＡＭＶ－ＲＴ、ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ又はＸＲＴである、請求項６３に記載のポリペプチド。

【請求項６９】

逆転写酵素が、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素に対して修飾されたＭ－ＭＬＶである、請求項６８に記載のポリペプチド。

【請求項７０】

Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインが、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される変異のうちの１つ以上を含む、請求項６９に記載のポリペプチド。

【請求項７１】

組込み酵素が、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ及びＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）、Ｍｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択される、請求項６３に記載のポリペプチド。

【請求項７２】

組込み酵素が、Ｂｘｂ１又はその変異体である、請求項６３に記載のポリペプチド。

【請求項７３】

ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼに特異的に結合するｇＲＮＡであって、

（ａ）ニッキングされたＤＮＡ鎖とハイブリダイズする、プライマー結合部位、

（ｂ）組込み酵素のための認識部位、及び

（ｃ）細胞ゲノム内の標的部位を認識し、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼによってニッキングされる鎖と相補的なゲノム鎖とハイブリダイズする標的認識配列

を含む、ｇＲＮＡ。

【請求項７４】

ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂ／ｃ／ｄ／ｅ／ｆ／ｇ／ｈ／ｉ／ｊからなる群から選択される、請求項７３に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７５】

プライマー結合部位が、ニッキングされたＤＮＡ鎖の３’末端とハイブリダイズする、請求項７３に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７６】

組込み酵素のための認識部位が、ａｔｔＢ部位、ａｔｔＰ部位、ａｔｔＬ部位、ａｔｔＲ部位、ｌｏｘ７１部位及びＦＲＴ部位から選択される、請求項７３に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７７】

組込み酵素のための認識部位が、Ｂｘｂ１部位である、請求項７３に記載のｇＲＮＡ。

【請求項７８】

細胞ゲノム内への２つ以上の核酸の部位特異的組込み方法であって、

（ａ）細胞内に

ｉ．逆転写酵素ドメインに連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼであって、ニッカー

ゼ活性を含む、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼ、及び
　　ｉｉ．各々、プライマー結合配列を含み、固有の組込み配列に連結している、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用し、細胞ゲノム内の所望の位置を標的とし、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、細胞ゲノムの鎖をニッキングし、逆転写酵素ドメインが、ニッキングされた部位内にｇＲＮＡの組込み配列の各々を組入れ、それによって細胞ゲノムの所望の位置に組込み部位を得る、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）
を導入することによって細胞ゲノム内の所望の位置に２つの組込み部位を組入れるステップ、並びに
　（ｂ）細胞内に
　　ｉ．核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡであって、各ＤＮＡが、直交組込み部位によって挟まれている、２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ、及び
　　ｉｉ．組込み酵素であって、組込み部位に相補的である又は関連する配列のインテグラーゼ、リコンビナーゼ又は逆転写酵素によって組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れることによって細胞の細胞ゲノムの所望の位置に核酸を導入する、組込み酵素
を導入することによって核酸を組み込むステップ
を含む、方法。
【請求項７９】
　細胞ゲノム内に挿入される２つの異なる組込み部位の各々が、異なるパリンドローム又は非パリンドローム中心ジヌクレオチドを含むａｔｔＢ配列である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
　細胞ゲノム内に挿入される２つの異なる組込み部位の各々が、異なるパリンドローム又は非パリンドローム中心ジヌクレオチドを含むａｔｔＰ配列である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８１】
　組込み酵素が、核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡの各々に、一対の直交するａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の組換えによるゲノム内への核酸の指向的に可能な組み込みを可能にさせる、請求項７８に記載の方法。
【請求項８２】
　組込み酵素が、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ及びＲ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）、Ｍｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８３】
　組込み酵素が、Ｂｘｂ１又はその変異体である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８４】
　遺伝子を含むＤＮＡが、細胞維持経路、細胞分裂又はシグナル変換経路に関与する遺伝子である、請求項７８に記載の方法。
【請求項８５】
　逆転写酵素ドメインが、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素ドメイン、転写ゼノポリメラーゼ（ＲＴＸ）又はトリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ＡＭＶ－ＲＴ）を含む、請求項７８に記載の方法。

【請求項８６】
ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８７】
ａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の対が、配列番号５及び配列番号６、配列番号７及び配列番号８、配列番号９及び配列番号１０、配列番号１１及び配列番号１２、配列番号１３及び配列番号１４、配列番号１５及び配列番号１６、配列番号１７及び配列番号１８、配列番号１９及び配列番号２０、配列番号２１及び配列番号２２、配列番号２３及び配列番号２４、配列番号２５及び配列番号２６、配列番号２７及び配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０、配列番号３１及び配列番号３２、配列番号３３及び配列番号３４並びに配列番号３５及び配列番号３６からなる群から選択される、請求項７８に記載の方法。
【請求項８８】
（ａ）ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結しており、逆転写酵素が、リンカーを介してリコンビナーゼ又はインテグラーゼに連結している、ベクター、
（ｂ）プライマー結合配列、組込み配列及びガイド配列を含む２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、
（ｃ）核酸並びにコードされたインテグラーゼ又はリコンビナーゼによって認識される一対の隣接するａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ鎖、並びに任意選択的に、
（ｄ）ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡ
を含む、細胞。
【請求項８９】
修飾されたゲノムを含む細胞であって、修飾が、細胞内に
（ａ）ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結している、ベクター、
（ｂ）各々が、プライマー結合配列、ゲノム組込み配列及びガイド配列を含む、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、並びに任意選択的に、
（ｃ）ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡ
を導入することによって細胞ゲノム内の２つの直交組込み部位の組入れを含む、細胞。
【請求項９０】
請求項９０に記載の細胞の細胞ゲノム内に２つ以上の核酸を組み込む方法であって、細胞内に
（ａ）各々が、核酸及び一対の隣接する直交組込み部位配列を含む、２つ以上のＤＮＡ、
（ｂ）核酸を含む２つ以上のＤＮＡの指向性連結を可能にする組込み部位配列を認識できる組込み酵素、並びに
（ｃ）第１のゲノム組込み配列を有する第１のＤＮＡの５’直交組込み配列及び最後のゲノム組込み配列を有する最後のＤＮＡの３’直交組込み配列の組み込みによる、細胞ゲノム内への核酸の組入れを可能にすることによる、細胞ゲノム内への２つ以上の核酸の組入れ
を導入するステップを含む、方法。
【請求項９１】
修飾されたゲノムを含む細胞であって、修飾されたゲノムの修飾が、細胞内に
（ａ）ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクター

であって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結している、ベクター、
（ｂ）各々が、プライマー結合配列、ゲノム組込み配列及びガイド配列を含む、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、並びに任意選択的に、
（ｃ）ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡ、
（ｄ）核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡであって、各ＤＮＡが、直交組込み部位によって挟まれている、２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ、並びに
（ｅ）組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れる組込み酵素
を導入することによる細胞ゲノム内の２つの直交組込み部位の組入れを含む、細胞。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２１年７月１６日に出願された米国仮特許出願第６３／２２２，５５０号及び２０２０年１０月２１日に出願された米国仮特許出願第６３／０９４，８０３号の利益を主張する。上記の参照特許出願の全内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
開示の分野
本明細書に開示された主題は、概して、疾患の処置及び診断のために部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用した部位特異的遺伝子操作のためのシステム、方法及び組成物を対象とする。
【背景技術】
【０００３】
ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート－ＣＲＩＳＰＲ関連タンパク質）免疫のＲＮＡガイドＤＮＡ標的化原理を使用したゲノムの編集は、広く利用されており、多種多様な用途のための強力なゲノム編集手段となっている。ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓシステムの主な利点は、プログラム可能なＤＮＡ干渉：カスタマイズ可能なデュアルＲＮＡ構造によって誘導される、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１２又は任意のプログラム可能なヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼについての最小の要件にある。Ｃａｓ９は、標的鎖を切断するためにＨＮＨヌクレアーゼドメインを使用するマルチドメイン酵素である。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９タンパク質－ＲＮＡ複合体は、ガイドＲＮＡ（ガイドＲＮＡ）によって標的上に局在化し、次いでＤＮＡ二本鎖切断（ｄｓＤＮＡ切断、ＤＳＢ）を生成するために切断される。切断後、ＤＮＡ修復機構が、切断された鎖を修復するために活性化される。修復機構は、一般に、２種類：非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は相同組換え（ＨＲ）のうちの１つに由来する。一般に、ＮＨＥＪは修復を支配し、エラーを発生しやすく、とりわけ、フレームシフト変異を引き起こすランダムなインデル（挿入又は欠失）を生成する。対照的に、ＨＲはより正確な修復能力を有し、正確な置換又は挿入を組入れることができる可能性がある。ＨＲを増強するために、いくつかの技法、例えば、ＤＳＢでの局在化を強化するためのＣａｓ９ヌクレアーゼの融合タンパク質と相同組換え修復（ＨＤＲ）エフェクターとの組合せ、重複する相同アームの導入、又はＮＨＥＪの抑制が試みられている。これらの技法のほとんどは、宿主のＤＮＡ修復システムに依存する。
【０００４】
最近、ガイドプライムエディター（ｇｕｉｄｅｄ　ｐｒｉｍｅ　ｅｄｉｔｏｒ）（ＰＥ）であるＰＥ１、ＰＥ２及びＰＥ３などの新たなガイドエディターが開発されている。例えば、Ｌｉｕ，Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　２０１９、５７６、１４９～１５７頁。これらのＰＥは、Ｃａｓ　９Ｈ　８４０Ａニッカーゼ（Ｃａｓ９ｎ（Ｈ８４０Ａ））と融合した逆転写酵素（ＲＴ）であり、ゲノム編集は、プライム編集ガイドＲＮＡ（ｐｅｇＲＮＡ）を使用して達成される。これらの開発にもかかわらず、プログラム可能な遺伝子組込みは、

依然として一般的に細胞経路又は修復プロセスに依存している。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００５】
【非特許文献１】Ｌｉｕ，Ｄ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　２０１９、５７６、１４９～１５７頁
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
したがって、遺伝子の編集及び送達のためのより効果的なツールが必要とされている。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
（要旨）
本開示は、細胞ゲノム内への核酸の部位特異的組込み方法を提供する。本方法は、逆転写酵素ドメインに連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼを細胞内に導入することによって細胞ゲノム内の所望の位置に組込み部位を組入れるステップであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、ニッカーゼ活性、及び組込み配列に連結しているプライマー結合配列を含むガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含み、ｇＲＮＡが、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用し、細胞ゲノム内の所望の位置を標的とし、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、細胞ゲノムの鎖をニッキングし、逆転写酵素ドメインが、ｇＲＮＡの組込み配列をニッキング部位に組入れ、それによって細胞ゲノムの所望の位置に組込み部位を得る、ステップを含む。方法は、細胞内に、組込み部位に相補的である又は関連する配列に連結している核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖、及び組込み酵素を導入することによって細胞ゲノム内に核酸を組み込むステップであって、組込み酵素が、組込み部位に相補的である又は関連する配列の組込み、組換え又は逆転写によって組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れ、それによって細胞の細胞ゲノムの所望の位置に核酸を導入する、ステップをさらに含む。
【０００８】
一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼによってニッキングされるゲノム鎖に対する細胞ゲノムの相補鎖とハイブリダイズされ得る。
【０００９】
一部の実施形態では、組込み酵素は、ペプチド又はそれをコードする核酸として導入され得る。
【００１０】
一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、ペプチド又はそれをコードする核酸として導入され得る。
【００１１】
一部の実施形態では、核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖は、ミニサークル、プラスミド、ｍＲＮＡ又は直鎖ＤＮＡとして細胞内に導入され得る。
【００１２】
一部の実施形態では、核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖は、１０００ｂｐ～１０，０００ｂｐであり得る。
【００１３】
一部の実施形態では、核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖は、１０，０００ｂｐ超であり得る。
【００１４】
一部の実施形態では、核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖は、１０００ｂｐ未満であり得る。
【００１５】
一部の実施形態では、核酸を含むＤＮＡは、ミニサークルとして細胞内に導入され得る。
【００１６】

一部の実施形態では、ミニサークルは、細菌起源の配列を含まなくてもよい。

【００１７】

一部の実施形態では、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、逆転写酵素ドメインに連結され得、組込み酵素は、リンカーを介して連結され得る。リンカーは、切断可能であり得る。リンカーは、切断可能でなくてもよい。リンカーは、逆転写酵素に連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼの２つの関連する結合ドメインに置き換えられ得る。

【００１８】

一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択され得る。

【００１９】

一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｂｘｂ１又はその変異体であり得る。

【００２０】

一部の実施形態では、組込み部位は、ａｔｔＢ部位、ａｔｔＰ部位、ａｔｔＬ部位、ａｔｔＲ部位、ｌｏｘ７１部位、Ｖｏｘ部位又はＦＲＴ部位から選択され得る。

【００２１】

一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂニッカーゼから選択され得る。

【００２２】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素ドメイン、転写ゼノポリメラーゼ（ｘｅｎｏｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ）（ＲＴＸ）、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ＡＭＶ－ＲＴ）及びユウバクテリウム・レクターレ（Ｅｕｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｒｅｃｔａｌｅ）マチュラーゼＲＴ（ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ）からなる群から選択され得る。

【００２３】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、野生型配列に対する変異を含み得る。

【００２４】

一部の実施形態では、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインは、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される１つ以上の変異を含み得る。

【００２５】

一部の実施形態では、方法は、第２のニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）を導入するステップをさらに含み得る。ｎｇＲＮＡは、相補鎖上のｇＲＮＡニックの９０塩基下流においてニッキングを指示し得る。

【００２６】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡ、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸、逆転写酵素、相補的組込み部位に連結している核酸を含むＤＮＡ、組込み酵素及び任意選択的にｎｇＲＮＡは、単一反応において細胞内に導入され得る。

【００２７】

一部の実施形態では、ｇＲＮＡ、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸、逆転写酵素、相補的組込み部位に連結している核酸を含むＤＮＡ、組込み酵素及び任意選択的にｎｇＲＮＡは、ウイルス、ＲＮＰ、ｍＲＮＡ、脂質又はポリマーナノ粒子を使用して導入さ

れ得る。
【００２８】
一部の実施形態では、核酸は、レポーター遺伝子であり得る。レポーター遺伝子は、蛍光タンパク質であり得る。
【００２９】
一部の実施形態では、細胞は、分裂細胞であり得る。
【００３０】
一部の実施形態では、細胞は、非分裂細胞であり得る。
【００３１】
一部の実施形態では、細胞ゲノム内の所望の位置は、変異遺伝子の遺伝子座であり得る。
【００３２】
一部の実施形態では、核酸は、小分子の存在下でのタンパク質のプログラム可能なノックダウンのための分解タグであり得る。
【００３３】
一部の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞又は植物細胞であり得る。
【００３４】
一部の実施形態では、核酸は、Ｔ細胞又はナチュラルキラー（ＮＫ）細胞内への組込みのための、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、インターロイキン、サイトカイン又は免疫チェックポイント遺伝子であり得る。ＴＣＲ、ＣＡＲ、インターロイキン、サイトカイン又は免疫チェックポイント遺伝子は、ミニサークルＤＮＡを使用してＴ細胞又はＮＫ細胞ゲノムの標的部位内に組入れられ得る。
【００３５】
一部の実施形態では、核酸は、ベータヘモグロビン（ＨＢＢ）遺伝子であり得、細胞は、造血幹細胞（ＨＳＣ）であり得る。ＨＢＢ遺伝子は、ミニサークルＤＮＡを使用してＨＳＣゲノム内の標的部位内に組入れられ得る。核酸は、ベータサラセミア又は鎌状赤血球貧血の原因となる遺伝子であり得る。
【００３６】
一部の実施形態では、核酸は、代謝遺伝子であり得る。代謝遺伝子は、アルファ－１アンチトリプシン欠損症又はオルニチントランスカルバミラーゼ（ＯＴＣ）欠損症に関与し得る。代謝遺伝子は、遺伝性疾患に関与している遺伝子であり得る。
【００３７】
一部の実施形態では、核酸は、遺伝性疾患又は遺伝性症候群に関与している遺伝子であり得る。遺伝性疾患は、嚢胞性線維症、家族性高コレステロール血症、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症、Ｘ連鎖ＳＣＩＤ（Ｘ－ＳＣＩＤ）、ウィスコット・アルドリッチ症候群（ＷＡＳ）、ヘモクロマトーシス、テイ・サックス病、脆弱Ｘ症候群、ハンチントン病、マルファン症候群、フェニルケトン尿症又は筋ジストロフィーであり得る。
【００３８】
本開示は、リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含む、ベクターを提供する。
【００３９】
一部の実施形態では、リンカーは、切断可能であり得る。
【００４０】
一部の実施形態では、リンカーは、切断可能でなくてもよい。
【００４１】
一部の実施形態では、リンカーは、逆転写酵素に連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼの２つの関連する結合ドメインを含み得る。
【００４２】
一部の実施形態では、組込み酵素は、条件付き活性化ドメイン又は条件付き発現ドメイ

ンを含み得る。
【００４３】
一部の実施形態では、組込み酵素は、エストロゲン受容体に融合し得る。
【００４４】
一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択され得る。
【００４５】
一部の実施形態では、逆転写酵素は、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素、ＡＭＶ－ＲＴ、ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ又はＲＴＸであり得る。逆転写酵素は、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素に対して修飾されたＭ－ＭＬＶ逆転写酵素であり得る。Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインは、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される変異のうちの１つ以上を含み得る。
【００４６】
一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、ΦＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、ΦＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、ΦＦＣ１、ΦＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、ΦＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択され得る。
【００４７】
一部の実施形態では、リコンビナーゼ又はインテグラーゼは、Ｂｘｂ１又はその変異体であり得る。
【００４８】
本開示は、リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターを含む細胞を提供する。細胞は、プライマー結合配列、組込み配列及びガイド配列を含むｇＲＮＡをさらに含み、ｇＲＮＡは、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる。細胞は、核酸及びコードされたインテグラーゼ、リコンビナーゼ又は逆転写酵素によって認識される配列を含むＤＮＡミニサークルをさらに含む。細胞は、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）をさらに含み、ｎｇＲＮＡは、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする。
【００４９】
一部の実施形態では、ミニサークルは、細菌起源の配列を含まなくてもよい。
【００５０】
一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、ΦＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、ΦＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、ΦＦＣ１、ΦＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、ΦＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択され得る。

【００５１】
一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｂｘｂ１又はその変異体であり得る。
【００５２】
一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａからなる群から選択され得る。
【００５３】
一部の実施形態では、逆転写酵素は、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素であり得る。逆転写酵素は、修飾されたＭ－ＭＬＶ逆転写酵素であり得る。Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素のアミノ酸配列は、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される１つ以上の変異を含み得る。
【００５４】
一部の実施形態では、細胞は、ｎｇＲＮＡを細胞に導入することをさらに含み得る。ｎｇＲＮＡは、＋９０ｎｇＲＮＡであり得る。＋９０ｎｇＲＮＡは、相補鎖上のｇＲＮＡニックの９０塩基下流においてニッキングを指示し得る。
【００５５】
本開示は、リンカーを介して組込み酵素に連結している逆転写酵素にＣ末端で連結している、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼを含むポリペプチドを提供する。
【００５６】
一部の実施形態では、リンカーは、切断可能であり得る。
【００５７】
一部の実施形態では、リンカーは、切断可能でなくてもよい。
【００５８】
一部の実施形態では、組込み酵素は、エストロゲン受容体に融合し得る。
【００５９】
一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択され得る。
【００６０】
一部の実施形態では、逆転写酵素は、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素、ＡＭＶ－ＲＴ、ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ又はＸＲＴであり得る。逆転写酵素は、野生型Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素に対して修飾されたＭ－ＭＬＶであり得る。Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素ドメインは、Ｄ２００Ｎ、Ｔ３０６Ｋ、Ｗ３１３Ｆ、Ｔ３３０Ｐ及びＬ６０３Ｗからなる群から選択される変異のうちの１つ以上を含み得る。
【００６１】
一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択され得る。
【００６２】
一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｂｘｂ１又はその変異体であり得る。
【００６３】
本開示は、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼに特異的に結合するｇＲＮＡであって、ニッキングされたＤＮＡ鎖とハイブリダイズする、プライマー結合部位、組込み酵素のための認識部位、及び細胞ゲノム内の標的部位を認識し、ＤＮＡ結合ヌクレアー

ゼによってニッキングされる鎖と相補的なゲノム鎖とハイブリダイズする標的認識配列を含む、ｇＲＮＡを提供する。

【００６４】

一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択され得る。

【００６５】

一部の実施形態では、プライマー結合部位は、ニッキングされたＤＮＡ鎖の３’末端とハイブリダイズし得る。

【００６６】

一部の実施形態では、組込み酵素のための認識部位は、ａｔｔＢ部位、ａｔｔＰ部位、ａｔｔＬ部位、ａｔｔＲ部位、ｌｏｘ７１部位及びＦＲＴ部位から選択され得る。

【００６７】

一部の実施形態では、組込み酵素のための認識部位は、Ｂｘｂ１部位であり得る。

【００６８】

本開示は、細胞ゲノム内への２つ以上の核酸の部位特異的組込み方法を提供する。方法は、細胞内に、逆転写酵素ドメインに連結しているＤＮＡ結合ヌクレアーゼであって、ニッカーゼ活性を含む、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼ、及び各々、プライマー結合配列を含み、固有の組込み配列に連結している２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用し、細胞ゲノム内の所望の位置を標的とし、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、細胞ゲノムの鎖をニッキングし、逆転写酵素ドメインが、ニッキングされた部位内にｇＲＮＡの組込み配列の各々を組入れ、それによって細胞ゲノムの所望の位置に組込み部位を得る、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を導入することによって細胞ゲノム内の所望の位置に２つの組込み部位を組入れるステップを含む。方法は、細胞内に、核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡであって、各ＤＮＡが、直交組込み部位によって挟まれている、２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ、及び組込み酵素であって、組込み部位に相補的である又は関連する配列のインテグラーゼ、リコンビナーゼ又は逆転写酵素によって組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れることによって細胞の細胞ゲノムの所望の位置に核酸を導入する、組込み酵素を導入することによって核酸を組み込むステップをさらに含む。

【００６９】

一部の実施形態では、細胞ゲノム内に挿入される２つの異なる組込み部位の各々は、異なるパリンドローム又は非パリンドローム中心ジヌクレオチドを含むａｔｔＢ配列であり得る。

【００７０】

一部の実施形態では、細胞ゲノム内に挿入される２つの異なる組込み部位の各々は、異なるパリンドローム又は非パリンドローム中心ジヌクレオチドを含むａｔｔＰ配列であり得る。

【００７１】

一部の実施形態では、組込み酵素が、核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡの各々に、一対の直交するａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の組換えによるゲノム内への核酸の指向的に可能な組み込みを可能にさせ得る。

【００７２】

一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、φＢＴ１、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、φＦＣ１、φＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、φＲＶ並びにＲ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ

４、Ｒ５、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ　１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼ並びにそれらの任意の変異体からなる群から選択され得る。

【００７３】

一部の実施形態では、組込み酵素は、Ｂｘｂ１又はその変異体であり得る。

【００７４】

一部の実施形態では、遺伝子を含むＤＮＡは、細胞維持経路、細胞分裂又はシグナル変換経路に関与する遺伝子であり得る。

【００７５】

一部の実施形態では、逆転写酵素ドメインは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素ドメイン、転写ゼノポリメラーゼ（ＲＴＸ）、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ＡＭＶ－ＲＴ）又はユウバクテリウム・レクターレマチュラーゼＲＴ（ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ）を含み得る。

【００７６】

一部の実施形態では、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼは、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ、Ｃａｓ９－Ｈ８４０Ａ及びＣａｓ１２ａ／ｂからなる群から選択され得る。

【００７７】

一部の実施形態では、ａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の対は、配列番号５及び配列番号６、配列番号７及び配列番号８、配列番号９及び配列番号１０、配列番号１１及び配列番号１２、配列番号１３及び配列番号１４、配列番号１５及び配列番号１６、配列番号１７及び配列番号１８、配列番号１９及び配列番号２０、配列番号２１及び配列番号２２、配列番号２３及び配列番号２４、配列番号２５及び配列番号２６、配列番号２７及び配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０、配列番号３１及び配列番号３２、配列番号３３及び配列番号３４並びに配列番号３５及び配列番号３６からなる群から選択され得る。

【００７８】

本開示は、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結しており、逆転写酵素が、リンカーを介してリコンビナーゼ又はインテグラーゼに連結している、ベクターを含む細胞を提供する。細胞は、プライマー結合配列、組込み配列及びガイド配列を含む２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたＤＮＡ結合ヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）をさらに含む。細胞は、核酸並びにコードされたインテグラーゼ又はリコンビナーゼによって認識される一対の隣接するａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ鎖をさらに含む。細胞は任意選択的に、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡをさらに含む。

【００７９】

本開示は、修飾されたゲノムを含む細胞であって、修飾が、細胞内に、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結している、ベクター、各々が、プライマー結合配列、ゲノム組込み配列及びガイド配列を含む、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、並びに任意選択的に、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡを導入することによって細胞ゲノム内の２つの直交組込み部位の組入れを含む、細胞を提供する。

【００８０】

本開示は、請求項９０に記載の細胞の細胞ゲノム内に２つ以上の核酸を組み込む方法であって、細胞内に、各々が、核酸及び一対の隣接する直交組込み部位配列を含む、２つ以

上のＤＮＡ、核酸を含む２つ以上のＤＮＡの指向性連結を可能にする組込み部位配列を認識できる組込み酵素、並びに第１のゲノム組込み配列を有する第１のＤＮＡの５’直交組込み配列及び最後のゲノム組込み配列を有する最後のＤＮＡの３’直交組込み配列を組み込みによる、細胞ゲノム内への核酸の組入れを可能にすることによる、細胞ゲノム内への２つ以上の核酸の組入れを導入するステップを含む、方法を提供する。

【００８１】

本開示は、修飾されたゲノムを含む細胞であって、修飾が、細胞内に、ニッカーゼ活性を含むＤＮＡ結合ヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターであって、ＤＮＡ結合ヌクレアーゼが、逆転写酵素にＣ末端で連結している、ベクター、各々が、プライマー結合配列、ゲノム組込み配列及びガイド配列を含む、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡが、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼと相互作用できる、２つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）、並びに任意選択的に、ニッカーゼ活性を含むコードされたヌクレアーゼに結合可能なニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）であって、ｇＲＮＡから離れた配列を標的とする、ｎｇＲＮＡ、核酸を含む２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡであって、各ＤＮＡが、直交組込み部位によって挟まれている、２つ以上のＤＮＡ又はＲＮＡ、並びに組込み部位において細胞ゲノム内に核酸を組入れる組込み酵素を導入することによる細胞ゲノム内の２つの直交組込み部位の組入れを含む、細胞を提供する。

【００８２】

本明細書に記載された実施形態の態様、特徴、利益及び利点は、以下の説明、添付の特許請求の範囲及び付属の図面に関して明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００８３】

【図１】本教示の実施形態に従う、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）の概念の概略図を示す。

【図２】本教示の実施形態に従う、プライム編集プロセスの概略図を示す。

【図３】本教示の実施形態に従う、様々なプラスミドの存在下でのＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株内のレンチウイルスを組み込んだｌｏｘ７１部位における緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）の組込み率を示す図である。

【図４】本教示の実施形態に従う、ｌｏｘ７１又はｌｏｘ６６の様々な長さの組入れについてのＨＥＫ２９３ＦＴゲノムの編集率を示す図である。

【図５Ａ】本教示の実施形態に従う、異なるＰＥ／Ｃｒｅベクターを用いたｌｏｘ７１部位の編集率を示す図である。

【図５Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞ゲノム内のｌｏｘ７１部位におけるＧＦＰの組込み率を示す図である。

【図６】本教示の実施形態に従う、ゲノム内へ核酸を組み込むためにＢｘｂ１を使用した概略的な描写を示す。

【図７】本教示の実施形態に従う、部位特異的標的化エレメントによるＢｘｂ１のプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用したａｔｔＢ遺伝子座へのＧＦＰ又はＧｌｕｃの組込み率を示す図である。

【図８】本教示の実施形態に従う、様々なＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡの、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）の編集率を示す図である。

【図９Ａ】本教示の実施形態に従う、ＳＵＰＴ１６Ｈマーカーが、ＰＡＳＴＥを使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。

【図９Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＳＲＲＭ２マーカーが、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。

【図９Ｃ】本教示の実施形態に従う、ＬＡＭＮＢ１マーカーが、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。

【図９Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＮＯＬＣ１マーカーが、部位特異的標的化エレメン

トによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。
【図９Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＮＯＬＣ１マーカーが、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。
【図９Ｆ】本教示の実施形態に従う、ＮＯＬＣ１マーカーが、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。
【図９Ｇ】本教示の実施形態に従う、ＤＥＰＤＣ４マーカーが、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用してＥＧＦＰによりタグ付けされている、細胞の蛍光画像を示す。
【図１０Ａ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥを使用したゲノム内のＡＣＴＢ　Ｎ末端部位でのＢｘｂ１　ａｔｔＢ部位の付加のための、青色でのリポフェクタミン支援トランスフェクションと、赤色でのエレクトロポレーション支援トランスフェクションとの比較を示す図である。
【図１０Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥを使用したゲノム内のＡＣＴＢ　Ｎ末端部位でのＥＧＦＰ組込みのための、青色でのリポフェクタミン支援トランスフェクションと、赤色でのエレクトロポレーション支援トランスフェクションとの比較を示す図である。
【図１１】本教示の実施形態に従う、様々なＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡを用いたＥＧＦＰ及びＧｌｕｃの組込みの図を示す。
【図１２】本教示の実施形態に従う、組込み酵素としてφＣ３１を使用した概略図を示す。
【図１３】本教示の実施形態に従う、外部の隣接するａｔｔＢ部位を組入れた固有のガイドＲＮＡを使用して複数の遺伝子座に複数の目的の遺伝子を挿入することを含む多重化の概略図を示す。
【図１４Ａ】本教示の実施形態に従う、右側のＧＴ－ＥＧＦＰを用いた直交する編集の図を示す。
【図１４Ｂ】本教示の実施形態に従う、右側のＧＡ－ｍＣｈｅｒｒｙを用いた直交する編集の図を示す。
【図１５Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ－ＥＧＦＰ及びＮＯＬＣ１－ｍＣｈｅｒｒｙの多重化の蛍光画像を示す。
【図１５Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ－ＥＧＦＰ及びＬＡＭＮＢ１－ｍＣｈｅｒｒｙの多重化の蛍光画像を示す。
【図１６Ａ】本教示の実施形態に従う、可能な多重化用途についてのａｔｔＢ／ａｔｔＰ組合せの直交性が示されている、９Ｘ９　ａｔｔＰ及びａｔｔＢの中心ジヌクレオチドバリアントの次世代シーケンシング結果並びにそれらの編集率を示す図である。
【図１６Ｂ】本教示の実施形態に従う、９Ｘ９　ａｔｔＰ及びａｔｔＢの中心ジヌクレオチドバリアントのヒートマップ並びにそれらの編集率を示す図である。
【図１７】本教示の実施形態に従う、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内でアルブミンガイド－ｐｅｇＲＮＡを使用したアルブミン遺伝子座へのセルピナ及びＣＰＳ１の組込みを示す図である。
【図１８】本教示の実施形態に従う、Ｔ細胞を操作するための異なる核酸についての概略を示す図である。
【図１９】本教示の実施形態に従う、初代Ｔ細胞内のＡＣＴＢ遺伝子座でのＥＧＦＰ組込みについての編集効率を示す図である。
【図２０】本教示の実施形態に従う、異なるｐｅｇＲＮＡを用いたＨＥＫ２９３ＦＴ内のＴＲＡＣ遺伝子座における編集を示す図である。
【図２１Ａ】本教示の実施形態に従う、ニッキングガイド１及び２を使用したＡＣＴＢ遺伝子座におけるａｔｔＢ組込みを示す図である。

【図２１Ｂ】本教示の実施形態に従う、ニッキングガイド１及び２を使用したＡＣＴＢ遺伝子座におけるＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２１Ｃ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ部位におけるＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２２Ａ】本教示の実施形態に従う、肝細胞癌細胞株ＨＥＰＧ２におけるＰＡＳＴＥ編集を示す図である。
【図２２Ｂ】本教示の実施形態に従う、慢性骨髄性白血病細胞株Ｋ５６２のＰＡＳＴＥ編集を示す図である。
【図２３Ａ】本教示の実施形態に従う、標的化及び非標的化ガイドによるａｔｔＢ付加を示す図である。
【図２３Ｂ】本教示の実施形態に従う、標的化及び非標的化ガイドによるＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２３Ｃ】本教示の実施形態に従う、変異誘発Ｂｘｂ１についてのＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２４Ａ】本教示の実施形態に従う、ｐｅｇＲＮＡについての設計パラメーターの概略を示す図である。
【図２４Ｂ】本教示の実施形態に従う、ニッキングガイドＲＮＡについての設計パラメーターの概略を示す図である。
【図２５Ａ】本教示の実施形態に従う、異なるＰＢＳ及びＲＴの長さを伴うＡＣＴＤ遺伝子座におけるＥＧＦＰの組込みを示す図である。
【図２５Ｂ】本教示の実施形態に従う、異なるＰＢＳ及びＲＴの長さを伴うＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＥＧＦＰの組込みを示す図である。
【図２５Ｃ】本教示の実施形態に従う、異なるＰＢＳ及びＲＴの長さを伴うＮＯＬＣ１遺伝子座におけるＥＧＦＰの組込みを示す図である。
【図２５Ｄ】本教示の実施形態に従う、異なるＰＢＳ及びＲＴの長さ並びに異なるニッキングガイドを伴うＧＲＳＦ１遺伝子座におけるＥＧＦＰの組込みを示す図である。
【図２５Ｅ】本教示の実施形態に従う、変異体ａｔｔＰ部位によるＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２５Ｆ】本教示の実施形態に従う、遺伝子の拡張パネルのＰＡＳＴＥ編集を示す図である。
【図２６Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ　ＥＧＰＦ編集を示す図である。
【図２６Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＨＩＴＩ　ＥＧＰＦ編集を示す図である。
【図２６Ｃ】本教示の実施形態に従う、１４個の遺伝子のパネルのＰＡＳＴＥ編集とＨＩＴＩ編集との比較を示す図である。
【図２６Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥ　Ｂｘｂ１オフターゲット組込みを示す図である。
【図２６Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥ　Ｃａｓ９オフターゲット組込みを示す図である。
【図２６Ｆ】本教示の実施形態に従う、異なるサイズの遺伝子挿入についてのＥＧＦＰ組込みを示す図である。
【図２７Ａ】本教示の実施形態に従う、ａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位の選択されたセット間の直交性を示す図である。
【図２７Ｂ】本教示の実施形態に従う、ａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位の選択されたセット間の直交性を示す図である。
【図２７Ｃ】本教示の実施形態に従う、操作されたジヌクレオチドの組合せを使用した直交ＰＡＳＴＥ編集についての概略を示す図である。
【図２８Ａ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるＡＣＴＢ及びＳＵＰＴ１６Ｈ遺伝子のＧＦＰタグ付けの蛍光画像を示す。

【図２８Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるＮＯＬＣ１及びＳＲＲＭ２遺伝子のＧＦＰタグ付けの蛍光画像を示す。
【図２８Ｃ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるＬＭＮＢ１及びＤＥＰＤＣ４遺伝子のＧＦＰタグ付けの蛍光画像を示す。
【図２８Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによる３つの内因性部位における直交遺伝子組込みを示す図である。
【図２８Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによる３つの内因性部位における一重、二重及び三重遺伝子挿入による多重化挿入を示す図である。
【図２８Ｆ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥを使用したＡＣＴＢ（ＥＧＦＰ）及びＮＯＬＣ１（ｍＣｈｅｒｒｙ）の多重化遺伝子タグ付けを伴う２つの単一細胞の蛍光画像を示す。
【図２８Ｇ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥを使用したＡＣＴＢ（ＥＧＦＰ）及びＬＭＮＢ１（ｍＣｈｅｒｒｙ）の多重化遺伝子タグ付けを伴う２つの単一細胞の蛍光画像を示す。
【図２９Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＢｘｂ１　ａｔｔＢ部位挿入のプライム編集効率を示す図である。
【図２９Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座に異なる長さのＢｘｂ１　ａｔｔＢを挿入する際のプライム編集効率を示す図である。
【図２９Ｃ】本教示の実施形態に従う、ランディング部位の両方向がプロファイリングされている（Ｆ、フォワード、及びＲ、リバース）、異なるインテグラーゼからのａｔｔＢ配列挿入のプライム編集効率を示す図である。
【図２９Ｄ】本教示の実施形態に従う、ランディング部位の両方向がプロファイリングされている（Ｆ、フォワード、及びＲ、リバース）、Ｂｘｂ１インテグラーゼ及びＣｒｅリコンビナーゼからのａｔｔＢ配列挿入のプライム編集効率を示す図である。
【図２９Ｅ】本教示の実施形態に従う、ガイド及び標的配列を示すＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ挿入の概略を示す図である。図２９Ｅは、出現順にそれぞれ配列番号４２８～４３１を開示している。
【図２９Ｆ】本教示の実施形態に従う、ランディング部位の両方向がプロファイリングされている（Ｆ、フォワード、及びＲ、リバース）、ＡＣＴＢ遺伝子座の５’末端を標的とするインテグラーゼのパネルとのＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の比較を示す図である。
【図２９Ｇ】本教示の実施形態に従う、Ｂｘｂ１インテグラーゼとＣｒｅリコンビナーゼとのＧＦＰカーゴ組込み効率の比較を示す図である。
【図２９Ｈ】本教示の実施形態に従う、異なるプライム及びインテグラーゼ成分に対するＰＡＳＴＥ編集活性の依存性を示す図である。
【図２９Ｉ】本教示の実施形態に従う、インテグラーゼ効率に対する単一ベクターＰＡＳＴＥ系（ＳｐＣａｓ９－ＲＴ－Ｐ２Ａ－Ｂｘｂ１）の滴定を示す図である。
【図２９Ｊ】本教示の実施形態に従う、内因性ＡＣＴＢ標的におけるＰＡＳＴＥ挿入効率に対するカーゴサイズの効果を示す図である。
【図２９Ｋ】本教示の実施形態に従う、複数のカーゴサイズについてのＰＡＳＴＥによる完全な挿入を示すゲル電気泳動を示す図である。
【図３０Ａ】本教示の実施形態に従う、生成される結果として生じるａｔｔＲ及びａｔｔＬ部位を含むＰＡＳＴＥ組込み、及び組込み接合部をアッセイするためのＰＣＲプライマーの概略を示す図である。
【図３０Ｂ】本教示の実施形態に従う、挿入が、インフレーム及びアウトオブフレームＧＦＰ組込み実験について、並びにプライムなしの対照について分析され、ＰＣＲ断片の予測サイズが、サブパネルの図３０Ａの概略に示されているプライマーを使用して示されている、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ挿入からの左組込み接合部のＰＣＲ及びゲル電気泳動読み出しを示す図である。
【図３０Ｃ】本教示の実施形態に従う、挿入が、インフレーム及びアウトオブフレームＧＦＰ組込み実験について、並びにプライムなしの対照について分析され、ＰＣＲ断片の予

測サイズが、サブパネルの図３０Ａの概略に示されているプライマーを使用して示されている、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ挿入からの右組込み接合部のＰＣＲ及びゲル電気泳動読み出しを示す図である。

【図３０Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢのＮ末端へのＰＡＳＴＥによるＧＦＰのインフレーム融合についての右組込み接合部について示されているサンガーシーケンシングを示す図である。

【図３０Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢのＮ末端へのＰＡＳＴＥによるＧＦＰのインフレーム融合についての左組込み接合部について示されているサンガーシーケンシングを示す図である。

【図３１Ａ】本教示の実施形態に従う、ｐｅｇＲＮＡ上で、ＰＢＳ、ＲＴ及びａｔｔＢの長さが、ａｔｔＢ挿入の効率を変化させ得、ニッキングガイド選択も、遺伝子全体の組込み効率に影響を及ぼす、約１ｋｂのＧＦＰ挿入のＰＡＳＴＥ組込みに影響を及ぼす様々なパラメーターの概略を示す図である。

【図３１Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みに対するＰＢＳ及びＲＴの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｃ】本教示の実施形態に従う、ＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みに対するＰＢＳ及びＲＴの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みに対するａｔｔＢの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みに対するａｔｔＢの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｆ】本教示の実施形態に従う、ＮＯＬＣ１遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みに対するａｔｔＢの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｇ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率に対する最小のＰＢＳ、ＲＴ及びａｔｔＢの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｈ】本教示の実施形態に従う、ＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率に対する最小のＰＢＳ、ＲＴ及びａｔｔＢの長さの影響を示す図である。

【図３１Ｉ】本教示の実施形態に従う、より長いｐｅｇＲＮＡ設計と比較した３８ｂｐのａｔｔＢを含有する最小限の小型のｐｅｇＲＮＡを用いたニッキングガイド、プライム及びＢｘｂ１の存在下及び非存在下でのＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みを示す図である。

【図３２Ａ】本教示の実施形態に従う、２つの異なるニッキングガイド設計によるＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ挿入効率を示す図である。

【図３２Ｂ】本教示の実施形態に従う、Ｂｘｂ１発現を伴う及び伴わない、標的及び非標的化スペーサー並びに一致したｐｅｇＲＮＡを用いたＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１におけるＰＡＳＴＥ編集効率を示す図である。

【図３３Ａ】本教示の実施形態に従う、異なるＢｘｂ１触媒変異体を用いたＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みを示す図である。

【図３３Ｂ】本教示の実施形態に従う、異なるＲＴ触媒変異体を用いたＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みを示す図である。

【図３４Ａ】本教示の実施形態に従う、内因性ゲノム遺伝子座のパネルにおけるＰＡＳＴＥによるＧＦＰ組込みを示す図である。

【図３４Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるＡＣＴＢ遺伝子座における異なる遺伝子カーゴのパネルの組込みを示す図である。

【図３４Ｃ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座における治療的に関連する遺伝子の組込み効率を示す図である。

【図３４Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座及びＳＲＲＭ２遺伝子座におけるインフレーム内因性遺伝子タグ付けによるＰＡＳＴＥによるＧＦＰを用いた内因性タンパク質タグ付けを示す図である。

【図３４Ｅ】本教示の実施形態に従う、ＮＯＬＣ１遺伝子座及びＬＭＮＢ１遺伝子座にお

けるインフレーム内因性遺伝子タグ付けによるＰＡＳＴＥによるＧＦＰを用いた内因性タンパク質タグ付けを示す図である。
【図３５】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるＬＭＮＢ１遺伝子座における異なる遺伝子カーゴのパネルの組込みを示す図である。
【図３６Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座における５ｋｂのＧＦＰ鋳型を用いた１６個全ての中心ジヌクレオチドａｔｔＢ／ａｔｔＰ配列対についてのＰＡＳＴＥ組込み効率を示す図である。
【図３６Ｂ】本教示の実施形態に従う、各ａｔｔＢジヌクレオチド配列に、１６個全てのａｔｔＰジヌクレオチド配列及びＢｘｂ１インテグラーゼのバーコード化プールを共トランスフェクトし、相対的組込み効率が、バーコードの次世代シーケンシングによって決定され、１６個全てのａｔｔＢジヌクレオチドが、ａｔｔｐプールを有するアレイフォーマットにおいてプロファイルされる、プールしたａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチド直交性アッセイの概略を示す図である。
【図３６Ｃ】本教示の実施形態に従う、プールした直交性アッセイによって決定される全ての可能なａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチド対についての相対的挿入選好性を示す図である。
【図３６Ｄ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥによるＧＦＰ組込みについて評価される上位４個のａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチド対の直交性を示す図である。
【図３７】本教示の実施形態に従う、各ウェブのロゴモチーフが、記載したジヌクレオチドを有する示したａｔｔＢ配列におけるプール内の異なるａｔｔＰ配列の相対的組込みを示す、プールしたレポーターアッセイによって測定した場合のＢｘｂ１ジヌクレオチドの直交性を示す図である。
【図３８Ａ】本教示の実施形態に従う、３つの蛍光カーゴ（ＧＦＰ、ｍＣｈｅｒｒｙ及びＹＦＰ）が、インフレーム遺伝子タグ付けについての３つの異なる遺伝子座（ＡＣＴＢ、ＬＭＮＢ１、ＮＯＬＣ１）において直交的に挿入される、特定のゲノム遺伝子座における異なるカーゴセットの多重化組込みの概略を示す図である。
【図３８Ｂ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ、ＬＭＮＢ１及びＮＯＬＣ１遺伝子座におけるフルオロフォアの組合せの多重化ＰＡＳＴＥ挿入の効率を示す図である。
【図３９Ａ】本教示の実施形態に従う、相同非依存的標的化組換え（ＨＩＴＩ）による挿入率と比較したＰＡＳＴＥによるゲノム遺伝子座のパネルにおけるＧＦＰ組込み効率を示す図である。
【図３９Ｂ】本教示の実施形態に従う、意図せぬインデルと比較して観察されたオンターゲットＥＧＦＰ組込み率が示されている、ＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１標的部位におけるＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩによる意図せぬインデル生成の比較を示す図である。
【図３９Ｃ】本教示の実施形態に従う、定量化が、単一細胞クローンカウントによるものであり、標的化及び非標的化ガイドが、ＨＤＲ挿入のために使用され、ＰＡＳＴＥに関して、標的化及び非標的化が、それぞれ、ＳｐＣａｓ９－ＲＴタンパク質の存在又は非存在を指す、同じ標的における相同組換え修復（ＨＤＲ）と比較したＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥによるＧＦＰ鋳型の組込みを示す図である。
【図３９Ｄ】本教示の実施形態に従う、生成した全ての単一細胞クローンにわたって測定した平均インデル率が示されている、ＡＣＴＢ標的部位におけるＰＡＳＴＥ及びＨＤＲベースのＥＧＦＰ挿入による意図せぬインデル生成の比較を示す図である。
【図３９Ｅ】本教示の実施形態に従う、Ｂｘｂ１及びＣａｓ９オフターゲット識別及び検出アッセイについての概略を示す図である。
【図３９Ｆ】本教示の実施形態に従う、ヒトゲノム内の予測されたＢｘｂ１オフターゲット部位におけるＧＦＰ組込み活性を示す図である。
【図３９Ｇ】本教示の実施形態に従う、予測されたＰＡＳＴＥ　ＡＣＴＢ　Ｃａｓ９ガイドオフターゲット部位におけるＧＦＰ組込み活性を示す図である。
【図３９Ｈ】本教示の実施形態に従う、予測されたＨＩＴＩ　ＡＣＴＢ　Ｃａｓ９ガイド

オフターゲット部位におけるＧＦＰ組込み活性を示す図である。
【図３９Ｉ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥによるゲノムワイドオフターゲット組込み部位をアッセイするための次世代シーケンシング法の概略を示す図である。
【図３９Ｊ】本教示の実施形態に従う、予測されたオンターゲット組込み結果が示されている、ゲノムワイド組込みアッセイを使用したオンターゲットＡＣＴＢ部位における読み取りのアラインメントを示す図である。
【図３９Ｋ】本教示の実施形態に従う、ＰＡＳＴＥについての３つの単一細胞クローン、及びプライムなしの条件についての３つの単一細胞クローンにわたるオンターゲット及びオフターゲット組込み事象の分析を示す図である。
【図３９Ｌ】本教示の実施形態に従う、オンターゲット部位が、７番染色体上のＡＣＴＢ遺伝子にある、ＰＡＳＴＥ編集を伴う代表的な単一細胞クローンについての組込み事象のマンハッタンプロットを示す図である。
【図４０Ａ】本教示の実施形態に従う、ＨｅｐＧ２細胞内のＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩにより媒介される挿入によって生成されたインデル率の比較を示す図である。
【図４０Ｂ】本教示の実施形態に従う、合成アンプリコンを使用した予測されたＢｘｂ１オフターゲット部位における編集を検出するためのｄｄＰＣＲアッセイの検証を示す図である。
【図４０Ｃ】本教示の実施形態に従う、合成アンプリコンを使用した予測されたＰＡＳＴＥ　ＡＣＴＢ　Ｃａｓ９ガイドオフターゲット部位における編集を検出するためのｄｄＰＣＲアッセイの検証を示す図である。
【図４０Ｄ】本教示の実施形態に従う、合成アンプリコンを使用した予測されたＨＩＴＩ　ＡＣＴＢ　Ｃａｓ９ガイドオフターゲット部位における編集を検出するためのｄｄＰＣＲアッセイの検証を示す図である。
【図４１Ａ】本教示の実施形態に従う、Ｂｘｂ１インテグラーゼ、ＥＧＦＰのＡＣＴＢ組込みを標的とするＰＡＳＴＥ、又はＢｘｂ１発現を伴わないＥＧＦＰ挿入のためのＡＣＴＢを標的とするプライム編集を発現するＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内の有意な差次的に調節された遺伝子の数を示す図である。
【図４１Ｂ】本教示の実施形態に従う、各ドットが、固有のｍＲＮＡ転写産物を表し、有意な転写産物が、上方制御（赤色）又は下方制御（青色）のいずれかに応じて影付きであり、発現変化倍率が、ＡＣＴＢ標的化ガイドのみの発現（カーゴを含む）に対して測定される、有意性（ｐ値）に対する配列決定されたｍＲＮＡの発現変化倍率を示すボルケーノプロットを示す図である。
【図４１Ｃ】本教示の実施形態に従う、遺伝子が、Ｂｘｂ１のみの発現、ＧＦＰのみの発現、ＥＧＦＰ挿入のためのＡＣＴＢを標的とするＰＡＳＴＥ、Ｂｘｂ１を伴わないＥＧＦＰ発現のためのＡＣＴＢを標的とするプライム、及びガイド／カーゴのみについて１００万あたりのカウント（ｃｐｍ）のそれらの対応するＺスコアにより示されている、Ｂｘｂ１のみの条件についての上位の有意に上方制御された及び下方制御された遺伝子を示す図である。
【図４２Ａ】本教示の実施形態に従う、細胞が、ＰＡＳＴＥ又はＣａｓ９誘導ＨＤＲを用いた挿入のためにプラスミドによりトランスフェクトされ、細胞分裂を停止させるためにアフィディコリンで処理され、ＰＡＳＴＥ及びＨＤＲの効率が、それぞれｄｄＰＣＲ又はアンプリコンシーケンシングにより読み出される、細胞周期阻害の存在下でのＰＡＳＴＥ能力の概略を示す図である。
【図４２Ｂ】本教示の実施形態に従う、アンプリコンシーケンシングによる細胞分裂読み出しの存在下又は非存在下での２つのＣａｓ９ガイドを用いたＥＭＸ１遺伝子座におけるＨＤＲによる単一変異の編集効率を示す図である。
【図４２Ｃ】本教示の実施形態に従う、細胞分裂の存在下又は非存在下でのＰＡＳＴＥを用いたＡＣＴＢ遺伝子座における最大で１３．３ｋｂの様々なサイズのＧＦＰ挿入の組込み効率を示す図である。

【図４２Ｄ】本教示の実施形態に従う、Ｋ５６２細胞内で２つのベクター（ＰＥ２及びＢｘｂ１）及び単一ベクター（ＰＥ２－Ｐ２Ａ－Ｂｘｂ１）設計を用いたＰＡＳＴＥ編集効率を示す図である。
【図４２Ｅ】本教示の実施形態に従う、初代ヒトＴ細胞内で単一ベクター（ＰＥ２－Ｐ２Ａ－Ｂｘｂ１）設計を用いたＰＡＳＴＥ編集効率を示す図である。
【図４２Ｆ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座における治療的に関連する遺伝子の組込み効率を示す図である。
【図４２Ｇ】本教示の実施形態に従う、セルピナ１及びＣＰＳ１導入遺伝子が、ｄｄＰＣＲ及び発光の両方による読み出しのためにＨＩＢＩＴルシフェラーゼによりタグ付けされている、ＰＡＳＴＥを組み込んだ導入遺伝子についてのタンパク質産生アッセイの概略を示す図である。
【図４２Ｈ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内のセルピナ１及びＣＰＳ１導入遺伝子の組込み効率を示す図である。
【図４２Ｉ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＨｅｐＧ２細胞内のセルピナ１及びＣＰＳ１導入遺伝子の組込み効率を示す図である。
【図４２Ｊ】本教示の実施形態に従う、ＨｅｐＧ２細胞内のセルピナ１－ＨＩＢＩＴ及びＣＰＳ１－ＨＩＢＩＴの細胞内レベルを示す図である。
【図４２Ｋ】本教示の実施形態に従う、ＨｅｐＧ２細胞内のセルピナ１－ＨＩＢＩＴ及びＣＰＳ１－ＨＩＢＩＴの分泌レベルを示す図である。
【図４３Ａ】本教示の実施形態に従う、５μＭのアフィディコリン処理によって遮断された非分裂ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内で有意に減少するＥＭＸ１遺伝子座のＨＤＲにより媒介される編集を示す図である。
【図４３Ｂ】本教示の実施形態に従う、５μＭのアフィディコリン処理によって遮断された分裂及び非分裂ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内のＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥにより媒介される挿入に対する挿入ミニサークルＤＮＡ量の効果を示す図である。
【図４３Ｃ】本教示の実施形態に従う、組込み効率の用量依存性を示す、ＡＡＶにより送達されたＧＦＰ鋳型を用いたＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込みを示す図である。
【図４４Ａ】本教示の実施形態に従う、正常なＰＡＳＴＥ　ＳＶ４０　ＮＬＳとｃ－Ｍｙｃ　ＮＬＳ／可変二分ＳＶ４０　ＮＬＳ設計とを比較した、３つの内因性遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ組込み活性を示す図である。
【図４４Ｂ】本教示の実施形態に従う、正常なＰＡＳＴＥ　ＳＶ４０　ＮＬＳとｃ－Ｍｙｃ　ＮＬＳ／可変二分ＳＶ４０　ＮＬＳ設計とを比較した、異なるＧＦＰミニサークル鋳型量を用いたＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ組込み活性を示す図である。
【図４５】本教示の実施形態に従う、ピューロマイシン成長選択マーカーを使用したＰＡＳＴＥ編集活性の改善を示す図である。
【図４６Ａ】本教示の実施形態に従う、タンパク質発現ルシフェラーゼアッセイによって測定した場合のＨＩＢＩＴでタグ付けされているセルピナ１及びＣＰＳ１遺伝子の組込みを示す図である。
【図４６Ｂ】本教示の実施形態に従う、タンパク質レベルの正確な定量化を可能にする、標準化されたＨＩＢＩＴラダーに正規化したタンパク質発現ルシフェラーゼアッセイによって測定した場合のＨＩＢＩＴでタグ付けされているセルピナ１及びＣＰＳ１遺伝子の組込みを示す図である。
【図４７Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＥＧＦＰ組込みのためにリンカー及び逆転写酵素（ＲＴ）修飾のパネルを用いたＰＡＳＴＥ構築物の最適化を示す図である。
【図４７Ｂ】内因性ＡＣＴＢ標的におけるＰＡＳＴＥ挿入効率に対するカーゴサイズの効果を示す図である。カーゴは、本教示の実施形態に従って、一定のモル量によりトランスフェクトした。
【図４８Ａ】本教示の実施形態に従う、ＡＣＴＢにおける異なる長さのＢｘｂＩＮＴ　Ａ

ｔｔＢ部位の挿入のためのプライム編集効率を示す図である。
【図４８Ｂ】本教示の実施形態に従う、標的化及び非標的化ガイドを用いたＡＣＴＢにおけるＢｘｂＩＮＴ　ＡｔｔＢ部位の挿入のためのプライム編集効率を示す図である。
【図４８Ｃ】ＡＣＴＢにおける異なるインテグラーゼ（Ｂｘｂ１、Ｔｐ９及びＢｔ１）のＡｔｔＢ部位の挿入のためのプライム編集効率を示す図である。ランディング部位の両方向は、本教示の実施形態に従って、プロファイリングされている（Ｆ、フォワード、Ｒ、リバース）。
【図４８Ｄ】本教示の実施形態に従う、ニッキングガイドを用いた及び用いていないＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰの挿入のためのＰＡＳＴＥ編集効率を示す図である。
【図４９Ａ】投薬量滴定及びタンパク質最適化によるＰＡＳＴＥ編集の最適化を示す図である。異なる用量の成分の単一ベクター送達により測定したＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率。
【図４９Ｂ】異なる比の成分の単一ベクター送達対ＥＧＦＰ鋳型ベクターにより測定したＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の図である。
【図４９Ｃ】異なるＲＴドメイン融合を用いたＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の図である。
【図４９Ｄ】異なるＲＴドメイン融合及びリンカーを用いたＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の図である。
【図４９Ｅ】変異体ＲＴドメインを用いたＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の図である。
【図４９Ｆ】変異ＢｘｂＩＮＴドメインを用いたＡＣＴＢにおけるＥＧＦＰのＰＡＳＴＥ組込み効率の図である。
【図５０Ａ】ＡＡＶ形質導入により送達された挿入鋳型の図である。ＰＡＳＴＥ編集機構はトランスフェクションにより送達され、鋳型は、示したレベルでのＡＡＶ投与により同時送達された。
【図５０Ｂ】３つのウイルスベクターを有する完全なＰＡＳＴＥ系のＡｄＶ送達の概略の図である。
【図５０Ｃ】ＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨｅｐＧ２細胞内のインテグラーゼ、ガイド及びカーゴのＡｄＶ送達の組込み効率の図である。ＢｘｂＩＮＴ及びガイドＲＮＡ又はカーゴは、プラスミドトランスフェクション（Ｐｌ）、ＡｄＶ形質導入（ＡｄＶ）又は除外（－）のいずれかにより送達された。ＳｐＣａｓ９－ＲＴは、プラスミドとしてのみ送達された又は除外された。
【図５０Ｄ】ＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨｅｐＧ２細胞内の全てのＰＡＳＴＥ成分のＡｄＶ送達の図である。
【図５０Ｅ】ＰＡＳＴＥ成分のｍＲＮＡ及び合成ガイド送達の概略の図である。
【図５０Ｆ】ＡｄＶ又はプラスミドカーゴのいずれかと対になった、ｍＲＮＡ及び合成ガイドを用いたＰＡＳＴＥ系成分の送達の図である。
【図５０Ｇ】合成ガイド及びＡｄＶ又はプラスミドカーゴのいずれかを用いた環状ｍＲＮＡの送達の図である。
【図５０Ｈ】初代ヒトＴ細胞内の単一ベクター設計を用いたＰＡＳＴＥ編集効率の図である。
【図５０Ｉ】初代ヒト肝細胞内の単一ベクター設計を用いたＰＡＳＴＥ編集効率の図である。
【図５１Ａ】ａｔｔＢ配列の挿入を組み合わせたＬＭＮＢ１の最初のエクソンの１３０ｂｐ及び３８５ｂｐ欠失を伴うＬＭＮＢ１遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ編集効率の図である。
【図５１Ｂ】ＰＡＳＴＥ系を使用した９６７ｂｐのカーゴの挿入を組み合わせたＬＭＮＢ１の最初のエクソンの１３０ｂｐの欠失を伴うＰＡＳＴＥ編集効率の図である。
【発明を実施するための形態】
【００８４】

明確にするために、以下の議論は、出願人の教示の実施形態の様々な態様を説明していることを理解されたい。具体的な実施形態は、包括的な説明として又は本明細書で論じられているより広い態様の限定として意図されていないことに留意されたい。特定の実施形態と併せて説明されている一態様は、必ずしもその実施形態に限定されず、任意の他の実施形態と実施されてもよい。本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「例示的な実施形態」という言及は、実施形態と関連して説明されている特定の特徴、構造又は特性が、本開示の少なくとも一実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体を通して様々な場所における「一実施形態では」、「実施形態では」又は「例示的な実施形態」という語句の出現は、必ずしも全てが同じ実施形態を指しているわけではないが、全てが同じ実施形態を指していてもよい。さらに、特定の特徴、構造又は特性は、本開示から当業者には明らかであるように、１つ以上の実施形態において任意の適切な様式で組み合わされてもよい。

【００８５】

一般的定義

別途定義されない限り、本明細書で使用されている技術用語及び科学用語は、本開示が関係する当業者が一般的に理解する意味と同一の意味を有する。分子生物学における一般的な用語及び技術の定義は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）（Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ及びＭａｎｉａｔｉｓ）；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、４ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１２）（Ｇｒｅｅｎ及びＳａｍｂｒｏｏｋ）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９８７）（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ．）；ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（１９９５）（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ及びＧ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）（Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ，ｅｄｓ．）：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａ Ｌａｂｏｒａｏｔｒｙ Ｍａｎｕａｌ、２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ ２０１３（Ｅ．Ａ．Ｇｒｅｅｎｆｉｅｌｄ ｅｄ．）；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（１９８７）（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ、ｅｄ．）；Ｂｅｎｊａｍｉｎ Ｌｅｗｉｎ、Ｇｅｎｅｓ ＩＸ、Ｊｏｎｅｓ及びＢａｒｔｌｅｔにより出版、２００８（ＩＳＢＮ ０７６３７５２２２３）；Ｋｅｎｄｒｅｗら（ｅｄｓ．）、Ｔｈｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．により出版、１９９４（ＩＳＢＮ ０６３２０２１８２９）；Ｒｏｂｅｒｔ Ａ．Ｍｅｙｅｒｓ（ｅｄ．）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ、ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．により出版、１９９５（ＩＳＢＮ ９７８０４７１１８５７１０）；Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎら、Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．、Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．１９９４）、Ｍａｒｃｈ、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．１９９２）；並びにＭａｒｔｅｎ Ｈ．Ｈｏｆｋｅｒ及びＪａｎ ｖａｎ Ｄｅｕｒｓｅｎ、Ｔｒａｎｓｇｅｎｉｃ Ｍｏｕｓｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ、２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２０１１）に見出され得る。

【００８６】

本明細書で使用されている場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その」は、文脈が別段明らかに示さない限り、単数及び複数の両方の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞」という言及は、複数のそのような細胞を含む。

【００８７】

本明細書で使用されている場合、「任意選択の」又は「任意選択的に」という用語は、その後に記載されている事象、状況又は置換基が、生じてもよく又は生じなくてもよいこと、並びにその記載が、その事象又は状況が生じる場合、及びそれが生じない場合を含むことを意味する。

【００８８】

端点による数値範囲の記述は、それぞれの範囲内に含まれる全ての数及び分数、並びに列挙された端点を含む。

【００８９】

本明細書で使用されている場合、「約」又は「およそ」という用語は、測定可能な値、例えば、パラメーター、量、時間的継続時間などを指し、特定の値の及びそれからの変動、例えば、特定の値の及びそれからの＋／－１０％以下、＋／－５％以下、＋／－１％以下、＋／－０．５％以下及び＋／－０．１％以下の変動を、そのような変動が本開示において実施するのに適切である限り、包含することを意味する。修飾語「約」又は「およそ」が言及する値はまた、それ自体で、具体的に、及び好ましくは、開示されていることを理解されたい。

【００９０】

本明細書で引用されている全ての刊行物及び参考文献は、それらの全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれることに留意されたい。本明細書で論じられている刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示のためだけに提供されている。本開示が、このような刊行物に先行する権利を与えられないという承認として解釈されるものは本明細書中にはない。さらに、提供されている刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、独立して確認される必要がある場合がある。

【００９１】

概説

本明細書に開示されている実施形態は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を使用した部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物を提供する。ＰＡＳＴＥの概念を示す概略図は図１に示されている。より詳細に以下で論じられているように、ＰＡＳＴＥは、標的ゲノム内への組込み部位の付加、それに続くその部位での目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列の挿入を含む。このプロセスは、細胞内の１つ以上の反応として行われ得る。標的ゲノム内への組込み部位の付加は、例えば、限定されないが、プライム編集、組換えアデノ随伴ウイルス（ｒＡＡＶ）媒介性核酸組込み、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮＳ）及びジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）を含む遺伝子編集技術を使用して行われる。組込み部位での導入遺伝子の組込みは、例えば、限定されないが、インテグラーゼ、リコンビナーゼ及び逆転写酵素を含むインテグラーゼ技術を使用して行われる。本明細書に開示されている部位特異的遺伝子操作に必要な成分は、少なくとも１つ以上のヌクレアーゼ、１つ以上のｇＲＮＡ、１つ以上の組込み酵素、及び組込み部位に相補的である又は関連し、細胞ゲノム内に挿入される目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列に連結している１つ以上の配列を含む。

【００９２】

本明細書に開示されている部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物の利点は、ＤＮＡ損傷応答に依存しない大きなエレメントのプログラム可能な挿入である。

【００９３】

本明細書に開示されている部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物の別の利点は、容易な多重化であり、複数の部位でのプログラム可能な挿入を可能にする。

【００９４】

本明細書に開示されている部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物の別の利点は、ミニサークル鋳型を介するスケーラブルな

産生及び送達である。

【００９５】

プライム編集

本開示は、組込み部位を標的ゲノム内へ付加するために、プライム編集などの遺伝子編集技術を使用した部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物を提供する。プライム編集は、より詳細に以下で論じられている。

【００９６】

プライム編集は、特定のＤＮＡ部位に新しい遺伝情報を直接書き込む多用途で正確なゲノム編集方法である。プライム編集の概念を示す概略図は図２に示されている。Ａｎｚａｌｏｎｅ，Ａ．Ｖ．ら、「Ｓｅａｒｃｈ－ａｎｄ－ｒｅｐｌａｃｅ ｇｅｎｏｍｅ ｅｄｉｔｉｎｇ ｗｉｔｈｏｕｔ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄ ｂｒｅａｋｓ ｏｒ ｄｏｎｏｒ ＤＮＡ」、Ｎａｔｕｒｅ ５７６、１４９～１５７頁（２０１９）を参照のこと。プライム編集は、操作された逆転写酵素（ＲＴ）に融合し、プライム編集ガイドＲＮＡ（ｐｅｇＲＮＡ）によりプログラムされている触媒的に損なわれたＣａｓ９エンドヌクレアーゼを使用する。当業者は、ｐｅｇＲＮＡが標的部位を特定し、所望の編集をコードすることの両方をすることを理解する。触媒的に損なわれたＣａｓ９エンドヌクレアーゼはまた、逆転写酵素に融合しているＣａｓ９ニッカーゼも含む。遺伝子編集の間、タンパク質のＣａｓ９ニッカーゼ部分は、ｐｅｇＲＮＡによってＤＮＡ標的部位に誘導される。次に逆転写酵素ドメインは、所望の編集の逆転写を鋳型化するためにｐｅｇＲＮＡを使用し、ニッキングされた標的ＤＮＡ鎖上にＤＮＡを直接重合する。編集されたＤＮＡ鎖は、オリジナルのＤＮＡ鎖を置き換え、１つの編集された鎖及び１つの編集されていない鎖を含有するヘテロ二本鎖を生じる。その後、プライムエディター（ＰＥ）が、編集されていない鎖へ編集をコピーすることを支持するためにヘテロ二本鎖の解消を誘導し、プロセスを完了する。

【００９７】

プライムエディターは、Ｃａ９ Ｈ８４０Ａニッカーゼに融合したモロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素（ＲＴ）を指す。ＲＴをＣａｓ９ニッカーゼのＣ末端に融合すると、より高い編集効率を生じる場合がある。このような複合体はＰＥ１と呼ばれる。Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）はまた、ＡＭＶ－ＲＴ又はＸＲＴ（Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）－ＡＭＶ－ＲＴ又はＸＲＴ）などの非Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素に連結され得る。一部の実施形態では、Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）は、Ｃａｓ１２ａ／ｂ又はＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）と置き換えられ得る。最大で約４５倍高い効率を有する、Ｍ－ＭＬＶ ＲＴ（Ｄ２００Ｎ／Ｌ６０３Ｗ／Ｔ３３０Ｐ／Ｔ３０６Ｋ／Ｗ３１３Ｆ）の五変異体（ｐｅｎｔａｍｕｔａｎｔ）に融合したＣａｓ９（野生型）、Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）、Ｃａｓ９（Ｄ１０Ａ）又はＣａｓ１２ａ／ｂニッカーゼはＰＥ２と呼ばれる。一部の実施形態では、Ｍ－ＭＬＶＲＴは、変異：Ｙ８Ｈ、Ｐ５１Ｌ、Ｓ５６Ａ、Ｓ６７Ｒ、Ｅ６９Ｋ、Ｖ１２９Ｐ、Ｌ１３９Ｐ、Ｔ１９７Ａ、Ｈ２０４Ｒ、Ｖ２２３Ｈ、Ｔ２４６Ｅ、Ｎ２４９Ｄ、Ｅ２８６Ｒ、Ｑ２９１Ｉ、Ｅ３０２Ｋ、Ｅ３０２Ｒ、Ｆ３０９Ｎ、Ｍ３２０Ｌ、Ｐ３３０Ｅ、Ｌ４３５Ｇ、Ｌ４３５Ｒ、Ｎ４５４Ｋ、Ｄ５２４Ａ、Ｄ５２４Ｇ、Ｄ５２４Ｎ、Ｅ５６２Ｑ、Ｄ５８３Ｎ、Ｈ５９４Ｑ、Ｅ６０７Ｋ、Ｄ６５３Ｎ及びＬ６７１Ｐのうちの１つ以上を含む。一部の実施形態では、逆転写酵素はまた、野生型又は修飾された転写ゼノポリメラーゼ（ＲＴＸ）、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（ＡＭＶ－ＲＴ）、ネコ免疫不全ウイルス逆転写酵素（ＦＩＶ－ＲＴ）、ＦｅＬＶ－ＲＴ（ネコ白血病ウイルス逆転写酵素）、ＨＩＶ－ＲＴ（ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素）又はユウバクテリウム・レクターレマチュラーゼＲＴ（ＭａｒａｔｈｏｎＲＴ）であり得る。ＰＥ３は、ＨＲを誘導するために鋳型として編集された鎖を使用して細胞に鎖を作り変えさせる可能性のある、編集されていない鎖のニッキングを伴う。編集されていない鎖のニッキングは、ニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）の使用を伴い得る。

【００９８】

編集されていない鎖のニッキングは、編集効率を増加させ得る。例えば、編集されてい

ない鎖のニッキングは、約１．１倍、約１．３倍、約１．５倍、約１．７倍、約１．９倍、約２．１倍、約２．３倍、約２．５倍、約２．７倍、約２．９倍、約３．１倍、約３．３倍、約３．５倍、約３．７倍、約３．９倍、４．１倍、約４．３倍、約４．５倍、約４．７倍、約４．９倍、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲、編集効率を増加させ得る。

【００９９】

最適なニッキング位置は、ゲノム部位に応じて異なるが、ｐｅｇＲＮＡ誘導ニッキングから約４０～９０ｂｐの編集に対して３’に位置するニッキングは、全体的に、過剰なインデルを形成せずに編集効率を増加させ得る。プライム編集の実施は、ｐｅｇＲＮＡ媒介ニッキングから約５０ｂｐの編集されていない鎖のニッキングからの開始、及びインデル頻度が許容可能なレベルを超えた場合、代替のニッキング位置の試験を可能にする。

【０１００】

本明細書で使用されている場合、「ガイドＲＮＡ」（ｇＲＮＡ）などの用語は、標的ゲノム内への目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列の挿入又は欠失を誘導するＲＮＡを指す。ｇＲＮＡはまた、プライム編集ガイドＲＮＡ（ｐｅｇＲＮＡ）、ニッキングガイドＲＮＡ（ｎｇＲＮＡ）及び単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を指すこともある。一部の実施形態では、「ｇＲＮＡ分子」という用語は、ｇＲＮＡをコードする核酸を指す。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ分子は天然に存在する。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ分子は天然に存在しない。一部の実施形態では、ｇＲＮＡ分子は合成ｇＲＮＡ分子である。ｇＲＮＡは、ゲノム内の核酸又は配列を標的とするためにＣａｓ９、Ｃａｓ１２ａ／ｂ、Ｃａｓ９（Ｈ８４０Ａ）又はＣａｓ９（Ｄ１０Ａ）分子などのヌクレアーゼ又はニッカーゼを標的とすることができる。一部の実施形態では、ｇＲＮＡは、逆転写酵素ドメインに結合したＤＮＡニッカーゼに結合することができる。本明細書で使用されている場合、「修飾されたｇＲＮＡ」は、細胞内に導入された後の非修飾ｇＲＮＡ分子と比較して、細胞内に導入された後に改善された半減期を有するｇＲＮＡ分子を指す。一部の実施形態では、ガイドＲＮＡは、インテグラーゼ、トランスポザーゼ又はリコンビナーゼによる認識のための挿入部位配列の付加を容易にすることができる。

【０１０１】

本明細書で使用されている場合、「プライム編集ガイドＲＮＡ」（ｐｅｇＲＮＡ）などの用語は、プライマー結合部位（ＰＢＳ）、逆転写酵素（ＲＴ）鋳型配列、及びリコンビナーゼ、インテグラーゼ又はトランスポザーゼによって認識され得る組込み部位配列を含む伸長された単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）を指す。ｐｅｇＲＮＡについての例示的な設計パラメーターは、図２４Ａに示されている。例えば、ＰＢＳは、少なくとも約４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ、２６ｎｔ、２７ｎｔ、２８ｎｔ、２９ｎｔ、３０ｎｔ、又はそれ以上のｎｔの長さを有することができる。例えば、ＰＢＳは、約４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ、２６ｎｔ、２７ｎｔ、２８ｎｔ、２９ｎｔ、３０ｎｔ、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲の長さを有することができる。例えば、ＲＴ鋳型配列は、少なくとも約４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ、２６ｎｔ、２７ｎｔ、２８ｎｔ、２９ｎｔ、３０ｎｔ、３１ｎｔ、３２ｎｔ、３３ｎｔ、３４ｎｔ、３５ｎｔ、３６ｎｔ、３７ｎｔ、３８ｎｔ、３９ｎｔ、４０ｎｔ、４１ｎｔ、４２ｎｔ、４３ｎｔ、４４ｎｔ、４５ｎｔ、４６ｎｔ、４７ｎｔ、４８ｎｔ、４９ｎｔ、５０ｎｔ、又はそれ以上のｎｔの長さを有することができる。例えば、ＲＴ鋳型配列は、約４ｎｔ、５ｎｔ、６ｎｔ、７ｎｔ、８ｎｔ、９ｎｔ、１０ｎｔ、１１ｎｔ、１２ｎｔ、１３ｎｔ、１４ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１７ｎ

ｔ、１８ｎｔ、１９ｎｔ、２０ｎｔ、２１ｎｔ、２２ｎｔ、２３ｎｔ、２４ｎｔ、２５ｎｔ、２６ｎｔ、２７ｎｔ、２８ｎｔ、２９ｎｔ、３０ｎｔ、３１ｎｔ、３２ｎｔ、３３ｎｔ、３４ｎｔ、３５ｎｔ、３６ｎｔ、３７ｎｔ、３８ｎｔ、３９ｎｔ、４０ｎｔ、４１ｎｔ、４２ｎｔ、４３ｎｔ、４４ｎｔ、４５ｎｔ、４６ｎｔ、４７ｎｔ、４８ｎｔ、４９ｎｔ、５０ｎｔ、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲の長さを有することができる。

【０１０２】

ゲノム編集の間、プライマー結合部位により、ニッキングされたＤＮＡ鎖の３’末端をｐｅｇＲＮＡにハイブリダイズすることができるが、ＲＴ鋳型は、編集された遺伝情報を合成するための鋳型として機能する。ｐｅｇＲＮＡは、例えば、限定されないが、（ｉ）編集される標的ヌクレオチド配列を識別すること、及び（ｉｉ）標的化された配列を置き換える新しい遺伝情報をコードすることを可能にする。一部の実施形態では、ｐｅｇＲＮＡは、（ｉ）編集される標的ヌクレオチド配列を識別すること、及び（ｉｉ）標的化された配列を置き換える組込み部位をコードすることを可能にする。

【０１０３】

本明細書で使用されている場合、「ニッキングガイドＲＮＡ」（ｎｇＲＮＡ）などの用語は、編集された鎖及び編集されていない鎖などの鎖をニッキングすることができるＲＮＡ配列を指す。ｎｇＲＮＡについての例示的な設計パラメーターは、図２４Ｂに示されている。ｎｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ誘導ニッキングの部位から約１ｎｔ以上離れた位置にニッキングを誘導することができる。例えば、ｎｇＲＮＡは、ｇＲＮＡ誘導ニッキングの部位から、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０ｎｔ又はそれ以上離れた位置においてニッキングすることができる。一部の実施形態では、ｎｇＲＮＡは、配列番号７４のガイド配列と共に配列番号７５を含む。本明細書で使用されている場合、「逆転写酵素」及び「逆転写酵素ドメイン」という用語は、ＲＮＡを相補的ＤＮＡに逆転写することができる酵素又は酵素的に活性なドメインを指す。逆転写酵素又は逆転写酵素ドメインは、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼである。そのような逆転写酵素ドメインは、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素又は修飾された逆転写酵素、例えば、限定されないが、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ（登録商標）逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ（登録商標）ＶＩＬＯ（商標）ｃＤＮＡ合成（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、ＲＴＸ、ＡＭＶ－ＲＴ及びＱｕａｎｔｉｓｃｒｉｐｔ逆転写酵素（Ｑｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を包含するが、これらに限定されない。

【０１０４】

本明細書に開示されているｐｅｇＲＮＡ－ＰＥ複合体は、ゲノム内の標的部位を認識し、Ｃａｓ９は、例えば、プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）鎖をニッキングする。ｐｅｇＲＮＡにおけるプライマー結合部位（ＰＢＳ）は、ＰＡＭ鎖とハイブリダイズする。編集配列を含有する、ＰＢＳに作動可能に連結されたＲＴ鋳型は、標的部位内へのＤＮＡに対するＲＴ鋳型の逆転写を指示する。編集された３’フラップと編集されていない５’フラップとの間の平衡化、細胞の５’フラップの切断及びライゲーション、並びにＤＮＡ修復により、安定的に編集されたＤＮＡが得られる。塩基編集を最適化するために、Ｃａｓ９ニッカーゼは、編集されていない鎖をニッキングするために使用され得、それによっ

て鋳型として編集された鎖を使用して、その鎖に対するＤＮＡ修復を指示する。
【０１０５】
インテグラーゼ技術
本開示は、インテグラーゼ技術を使用した部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物を提供する。インテグラーゼ技術は、より詳細に以下で論じられている。
【０１０６】
本明細書で使用されているインテグラーゼ技術は、プライム編集ヌクレアーゼなどのヌクレアーゼを介して組込み部位内への目的の遺伝子又は目的の核酸配列の組込みを指示するタンパク質又はタンパク質をコードする核酸を含む。組込みを指示するタンパク質は、組込み酵素などの酵素であり得る。組込み酵素は、組込みによって組込み部位において細胞ゲノム内に目的のゲノム又は核酸を組入れるインテグラーゼであり得る。組込み酵素は、組換えによって組込み部位において細胞ゲノム内に目的のゲノム又は核酸を組入れるリコンビナーゼであり得る。組込み酵素は、逆転写によって組込み部位において細胞ゲノム内に目的のゲノム又は核酸を組入れる逆転写酵素であり得る。組込み酵素は、レトロ転位によって組込み部位において細胞ゲノム内に目的のゲノム又は核酸を組入れるレトロトランスポザーゼであり得る。
【０１０７】
本明細書で使用されている場合、「組込み酵素」という用語は、単一の反応又は複数の反応において、細胞のゲノム内の所望の位置又は組込み部位内に目的の遺伝子又は目的の核酸配列を組み込むために使用される酵素又はタンパク質を指す。組込み酵素の例には、例えば、限定されないが、Ｃｒｅ、Ｄｒｅ、Ｖｉｋａ、Ｂｘｂ１、ΦＣ３１、ＲＤＦ、ＦＬＰ、ΦＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、ＴＰ９０１－１、Ａ１１８、ΦＦＣ１、ΦＣ１、ＭＲ１１、ＴＧ１、φ３７０．１、Ｗβ、ＢＬ３、ＳＰＢｃ、Ｋ３８、Ｐｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ、ＢｘＺ２、ΦＲＶ並びにＲ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２　Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ１）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ　１）及びＭｉｎｏｓによってコードされるレトロトランスポザーゼが含まれる。一部の実施形態では、「組込み酵素」という用語は、上述の酵素をコードする核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）を指す。一部の実施形態では、Ｃｒｅリコンビナーゼは、Ｃｒｅリコンビナーゼ発現プラスミド（配列番号７１）から発現される。
【０１０８】
哺乳動物発現プラスミドは、以下の表１に見出され得る。
【０１０９】

【表１】

表1

名前	完全な説明	配列番号:
PE2-Bxb1 単一ベクター	pCMV-PE2-P2A-Bxb1	(配列番号: 381)
PE2 プライムエディター	pCMV-PE2/Addgene #132775	(配列番号: 382)
PE2*-Bxb1 単一ベクター	新しい NLS pCMV-PE2-P2A-Bxb1	(配列番号: 383)
PASTEv3	pCMV-SpCas9-XTEN-RT(1-478)-Sto7d-GGGGS-BxbINT	(配列番号: 384)
ACTB pegRNA	ACTB N 末端 PBS 13 RT 29 attB 46 pegRNA	(配列番号: 385)
ACTB　ニッキング　+48	ACTB N 末端 ニッキングガイド　1 +48 ガイド	(配列番号: 386)
Bxb1　インテグラーゼ	pCAG-NLS-HA-Bxb1 インテグラーゼ/Addgene #51271	(配列番号: 387)
TP901-1　インテグラーゼ	TP901-1　インテグラーゼ	(配列番号: 388)
PhiBT　インテグラーゼ	PhiBT　インテグラーゼ	(配列番号: 389)
HDR sgRNA ガイド	ミニサークル U6-sgRNA EFS-SpCas9	(配列番号: 390)
HDR EGFP カーゴ	EGFP を有する Cas9 HDR 鋳型部位	(配列番号: 391)
AAV ヘルパープラスミド	PDF6 AAV ヘルパープラスミド	(配列番号: 392)
AAV EGFP ドナー	GFP AAV ドナープラスミド	(配列番号: 393)
AAV2/8	AAV2/8 カプシドタンパク質	(配列番号: 394)

【０１１０】

ミニサークルカーゴ遺伝子マップは、以下の表２に見出され得る。

【０１１１】

【表２】

表2

名前	完全な説明	配列番号:
カーゴ EGFP	親ミニサークルプラスミド-attP Bxb1 部位を有するカーゴ EGFP	(配列番号: 76)
切断後カーゴ EGFP	attP Bxb1 部位を有するカーゴ EGFP-ミニサークル切断後	(配列番号: 395)
融合のためのカーゴ EGFP	親ミニサークルプラスミド-融合のための attP Bxb1 部位を有するカーゴ EGFP	(配列番号: 396)
切断後 mCherry カーゴ	attP Bxb1 部位を有するカーゴ mCherry-ミニサークル切断後	(配列番号: 397)
切断後 YFP カーゴ	attP Bxb1 部位を有するカーゴ YFP-ミニサークル切断後	(配列番号: 398)
切断後セルピナ 1 カーゴ	attP Bxb1 部位を有するカーゴセルピナ 1-ミニサークル切断後	(配列番号: 399)
切断後 CPS1 カーゴ	attP Bxb1 部位を有するカーゴ CPS1-ミニサークル切断後	(配列番号: 400)
CFTR カーゴ	親ミニサークルプラスミド-attP Bxb1 部位を有するカーゴ CFTR	(配列番号: 401)
切断後 NYESO TCR カーゴ	attP Bxb1 部位を有するカーゴ NYESO TCR-ミニサークル切断後	(配列番号: 402)

【０１１２】

一部の実施形態では、φＣ３１ファージ由来のセリンインテグラーゼφＣ３１が、組込み酵素として使用される。ｐｅｇＲＮＡと組み合わせたインテグラーゼφＣ３１は、偽ａｔｔＰ組込み部位（配列番号７８）を挿入するために使用され得る。目的の遺伝子又は核酸及びａｔｔＢ（配列番号３）部位を含有するＤＮＡミニサークルが、細胞のゲノム内に目的の遺伝子又は核酸を組み込むために使用され得る。この組込みは、φＣ３１インテグラーゼを有する発現ベクターの共トランスフェクションによって補助され得る。

【０１１３】

本明細書で使用されている場合、「インテグラーゼ」という用語は、野生型インテグラーゼ及び様々な変異体又は修飾インテグラーゼのいずれかを含む、バクテリオファージ由来のインテグラーゼを指す。本明細書で使用されている場合、「インテグラーゼ複合体」という用語は、インテグラーゼ及び組込み宿主因子（ＩＦ）を含む複合体を指す場合がある。本明細書で使用されている場合、「インテグラーゼ複合体」などの用語はまた、インテグラーゼ、組込み宿主因子及びバクテリオファージＸ由来の切除酵素（ｅｘｃｉｓｉｏｎａｓｅ）（Ｘｉｓ）を含む複合体を指す場合もある。

【０１１４】

本明細書で使用されている場合、「リコンビナーゼ」などの用語は、リコンビナーゼ認識配列間のＤＮＡの組換えを媒介し、その結果、リコンビナーゼ認識配列間のＤＮＡ断片の切除、組込み、逆位又は交換（例えば、転座）が生じる部位特異的酵素を指す。リコンビナーゼは、２つの異なるファミリー：セリンリコンビナーゼ（例えば、リゾルバーゼ及びインベルターゼ）及びチロシンリコンビナーゼ（例えば、インテグラーゼ）に分類され得る。セリンリコンビナーゼの例には、限定されないが、Ｈｉｎ、Ｇｉｎ、Ｔｎ３、β－ｓｉｘ、ＣｉｎＨ、ＰａｒＡ、γδ、Ｂｘｂ１、φＣ３１、ＴＰ９０１、ＴＧ１、φＢＴ１、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４、Ｒ５、φＲＶ１、φＦＣ１、ＭＲ１１、Ａ１１８、Ｕ１５３及びｇｐ２９が含まれる。セリンリコンビナーゼの例にはまた、限定されないが、マイコバクテリア（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａｌ）ファージ由来のリコンビナーゼＰｅａｃｈｅｓ、Ｖｅｒａｃｒｕｚ、Ｒｅｂｅｕｃａ、Ｔｈｅｉａ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、ＫＳＳＪＥＢ、ＰａｔｔｙＰ、Ｄｏｏｍ、Ｓｃｏｗｌ、Ｌｏｃｋｌｅｙ、Ｓｗｉｔｚｅｒ、Ｂｏｂ３、Ｔｒｏｕｂｅ、Ａｂｒｏｇａｔｅ、Ａｎｇｌｅｒｆｉｓｈ、Ｓａｒｆｉｒｅ、ＳｋｉＰｏｌｅ、ＣｏｎｃｅｐｔＩＩ、Ｍｕｓｅｕｍ、Ｓｅｖｅｒｕｓ、Ａｉｒｍｉｄ、Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、Ｈｉｎｄｅｒ、ＩＣｌｅａｒｅｄ、Ｓｈｅｅｎ、Ｍｕｎｄｒｅａ及びＢｘＺ２が含まれる。チロシンリコンビナーゼの例には、限定されないが、Ｃｒｅ、ＦＬＰ、Ｒ、Ｌａｍｂｄａ、ＨＫ１０１、ＨＫ０２２及びｐＳＡＭ２が含まれる。セリン及びチロシンリコンビナーゼの名前は、リコンビナーゼがＤＮＡを攻撃するために使用し、鎖交換中にＤＮＡに共有結合する保存された求核性アミノ酸残基に由来する。

【０１１５】

リコンビナーゼは、遺伝子ノックアウト／ノックインの生成及び遺伝子治療用途を含む、多数の用途を有する。例えば、Ｂｒｏｗｎら、「Ｓｅｒｉｎｅ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅｓ ａｓ ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ ｇｅｎｏｍｅ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ.」 Ｍｅｔｈｏｄｓ、２０１１；５３（４）：３７２～９頁；Ｈｉｒａｎｏら、「Ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅｓ ａｓ ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ ｈｅｔｅｒｏｌｏｇｏｕｓ ｇｅｎｅ ｉｎｔｅｇｒａｔｉｏｎ.」 Ａｐｐｌ.Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ.Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ.２０１１；９２（２）：２２７～３９頁；Ｃｈａｖｅｚ及びＣａｌｏｓ、「Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｔｈｅ ΦＣ３１ ｉｎｔｅｇｒａｓｅ ｓｙｓｔｅｍ.」 Ｃｕｒｒ.Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ.２０１１；１１（５）：３７５～８１頁；Ｔｕｒａｎ及びＢｏｄｅ、「Ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅｓ：ｆｒｏｍ ｔａｇ－ａｎｄ－ｔａｒｇｅｔ－ ｔｏ ｔａｇ－ａｎｄ－ｅｘｃｈａｎｇｅ－ｂａｓｅｄ ｇｅｎｏｍｉｃ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎｓ.」 ＦＡＳＥＢ Ｊ.２０１１；２５（１２）：４０８８～１０７頁；Ｖｅｎｋｅｎ ａｎｄ Ｂｅｌｌｅｎ、「Ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ ｗｉｔｈ ｔｒａｎｓｐｏｓｏｎｓ，Ｆｌｐ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅ，ａｎｄ ΦＣ３１ ｉｎｔｅｇｒａｓｅ.」 Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ.Ｂｉｏｌ.２０１２；８５９：２０３～２８頁；Ｍｕｒｐｈｙ、「Ｐｈａｇｅ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｓｅｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ.」 Ａｄｖ.Ｖｉｒｕｓ Ｒｅｓ.２０１２；８３：３６７～４１４頁；Ｚｈａｎｇら、「Ｃｏｎｄｉｔｉｏｎａｌ ｇｅｎｅ ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｏｎ：Ｃｒｅａｔｉｎｇ ａ ｎｅｗ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｅｒａ.」 Ｊ.Ｚｈｅｊｉａｎｇ Ｕｎｉｖ.Ｓｃｉ.Ｂ.２０１２；１３（７）：５１１～２４頁；Ｋａｒｐｅｎｓｈｉｆ及びＢｅｒｎｓｔｅｉｎ、「Ｆｒｏｍ ｙｅａｓｔ ｔｏ ｍａｍｍａｌｓ：ｒｅｃｅｎｔ ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ ｇｅｎｅｔｉｃ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ.」 ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ（Ａｍｓｔ）.２０１２；１；１１（１０）：７８１～８頁を参照のこと。各々の全内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１６】

本明細書で提供されているリコンビナーゼは、本開示の実施形態において使用され得るリコンビナーゼの排他的な例であることを意味するものではない。本開示の方法及び組成

物は、新しい直交リコンビナーゼについてのデータベースをマイニングすることによって、又は規定されたＤＮＡ特異性を有する合成リコンビナーゼを設計することによって拡張され得る（例えば、Ｇｒｏｔｈら、「Ｐｈａｇｅ ｉｎｔｅｇｒａｓｅｓ：ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．」 Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２００４；３３５、６６７～６７８頁；Ｇｏｒｄｌｅｙら、「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｐｒｏｇｒａｍｍａｂｌｅ ｉｎｔｅｇｒａｓｅｓ．」 Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２００９；１０６、５０５３～５０５８頁を参照のこと。各々の全内容はそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１１７】

本明細書に記載されているシステム、方法及び組成物において有用なリコンビナーゼの他の例は当業者に公知であり、発見又は生成されている任意の新しいリコンビナーゼが、本開示の異なる実施形態において使用され得ると予測される。

【０１１８】

本明細書で使用されている場合、「レトロトランスポザーゼ」などの用語は、少なくとも１つの酵素が逆転写酵素ドメインを有する酵素又は１つ以上の酵素の組合せを指す。レトロトランスポザーゼは、異種核酸の長い配列（例えば、３０００ヌクレオチドを超える）をゲノム内に挿入することができる。レトロトランスポザーゼの例には、例えば、限定されないが、Ｒ２、Ｌ１、Ｔｏｌ２ Ｔｃ１、Ｔｃ３、Ｍａｒｉｎｅｒ（Ｈｉｍａｒ １）、Ｍａｒｉｎｅｒ（ｍｏｓ １）、Ｍｉｎｏｓ及びそれらの任意の変異体などのエレメントによってコードされるレトロトランスポザーゼが含まれる。

【０１１９】

一部の実施形態では、目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列は、相補的又は関連する組込み部位に連結されている核酸をコードするレトロトランスポゾンなどのＲＮＡ断片を使用してゲノム内の所望の位置に挿入される。レトロトランスポゾンを使用したゲノム内の所望の位置の位置への目的の核酸の挿入は、レトロトランスポザーゼによって補助される。

【０１２０】

本明細書に開示されている目的の遺伝子及び核酸配列は、当該技術分野で公知の任意の遺伝子及び核酸配列であり得る。目的の遺伝子及び核酸配列は、治療及び／又は診断用途のためであり得る。目的の遺伝子の例には、限定されないが、ＧＢＡ、ＢＴＫ、ＡＤＡ、ＣＮＧＢ３、ＣＮＧＡ３、ＡＴＦ６、ＧＮＡＴ２、ＡＢＣＡ１、ＡＢＣＡ７、ＡＰＯＥ、ＣＥＴＰ、ＬＩＰＣ、ＭＭＰ９、ＰＬＴＰ、ＶＴＮ、ＡＢＣＡ４、ＭＦＳＤ８、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＥＲＣＣ６、ＨＭＣＮ１、ＨＴＲＡ１、ＭＣＤＲ４、ＭＣＤＲ５、ＡＲＭＳ２、Ｃ２、Ｃ３、ＣＦＢ、ＣＦＨ、ＪＡＧ１、ＮＯＴＣＨ２、ＣＡＣＮＡ１Ｆ、ＳＥＲＰＩＮＡ１、ＴＴＲ、ＧＳＮ、Ｂ２Ｍ、ＡＰＯＡ２、ＡＰＯＡ１、ＯＳＭＲ、ＥＬＰ４、ＰＡＸ６、ＡＲＧ、ＡＳＬ、ＰＩＴＸ２、ＦＯＸＣ１、ＢＢＳ１、ＢＢＳ１０、ＢＢＳ２、ＢＢＳ９、ＭＫＫＳ、ＭＫＳ１、ＢＢＳ４、ＢＢＳ７、ＴＴＣ８、ＡＲＬ６、ＢＢＳ５、ＢＢＳ１２、ＴＲＩＭ３２、ＣＥＰ２９０、ＡＤＩＰＯＲ１、ＢＢＩＰ１、ＣＥＰ１９、ＩＦＴ２７、ＬＺＴＦＬ１、ＤＭＤ、ＢＥＳＴ１、ＨＢＢ、ＣＹＰ４Ｖ２、ＡＭＡＣＲ、ＣＹＰ７Ｂ１、ＨＳＤ３Ｂ７、ＡＫＲ１Ｄ１、ＯＰＮ１ＳＷ、ＮＲ２Ｆ１、ＲＬＢＰ１、ＲＧＳ９、ＲＧＳ９ＢＰ、ＰＲＯＭ１、ＰＲＰＨ２、ＧＵＣＹ２Ｄ、ＣＡＣＤ、ＣＨＭ、ＡＬＡＤ、ＡＳＳ１、ＳＬＣ２５Ａ１３、ＯＴＣ、ＡＣＡＤＶＬ、ＥＴＦＤＨ、ＴＭＥＭ６７、ＣＣ２Ｄ２Ａ、ＲＰＧＲＩＰ１Ｌ、ＫＣＮＶ２、ＣＲＸ、ＧＵＣＡ１Ａ、ＣＥＲＫＬ、ＣＤＨＲ１、ＰＤＥ６Ｃ、ＴＴＬＬ５、ＲＰＧＲ、ＣＥＰ７８、Ｃ２１ｏｒｆ２、Ｃ８ＯＲＦ３７、ＲＰＧＲＩＰ１、ＡＤＡＭ９、ＰＯＣ１Ｂ、ＰＩＴＰＮＭ３、ＲＡＢ２８、ＣＡＣＮＡ２Ｄ４、ＡＩＰＬ１、ＵＮＣ１１９、ＰＤＥ６Ｈ、ＯＰＮ１ＬＷ、ＲＩＭＳ１、ＣＮＮＭ４、ＩＦＴ８１、ＲＡＸ２、ＲＤＨ５、ＳＥＭＡ４Ａ、ＣＯＲＤ１７、ＰＤＥ６Ｂ、ＧＲＫ１、ＳＡＧ、ＲＨＯ、ＣＡＢＰ４、ＧＮＢ３、ＳＬＣ２４Ａ１、ＧＮＡＴ１、ＧＲＭ６、ＴＲＰＭ１、ＬＲＩＴ３、ＴＧＦＢＩ、ＴＡＣＳＴＤ２、ＫＲＴ１２、ＯＶＯＬ２、ＣＰＳ１、ＵＧＴ１Ａ１、ＵＧＴ１Ａ９、ＵＧＴ１Ａ８、ＵＧＴ１Ａ７、ＵＧ

ＴＡ６、ＵＧＴＡ５、ＵＧＴＡ４、ＣＦＴＲ、ＤＬＤ、ＥＦＥＭＰ１、ＡＢＣＣ２、ＺＮＦ４０８、ＬＲＰ５、ＦＺＤ４、ＴＳＰＡＮ１２、ＥＶＲ３、ＡＰＯＢ、ＳＬＣ２Ａ２、ＬＯＣ１０６６２７９８１、ＧＢＡ１、ＮＲ２Ｅ３、ＯＡＴ、ＳＬＣ４０Ａ１、Ｆ８、Ｆ９、ＵＲＯＤ、ＣＰＯＸ、ＨＦＥ、ＪＨ、ＬＤＬＲ、ＥＰＨＸ１、ＴＪＰ２、ＢＡＡＴ、ＮＢＡＳ、ＬＡＲＳ１、ＨＡＭＰ、ＨＪＶ、ＲＳ１、ＡＤＡＭＴＳ１８、ＬＲＡＴ、ＲＰＥ６５、ＬＣＡ５、ＭＥＲＴＫ、ＧＤＦ６、ＲＤ３、ＣＣＴ２、ＣＬＵＡＰ１、ＤＴＨＤ１、ＮＭＮＡＴ１、ＳＰＡＴＡ７、ＩＦＴ１４０、ＩＭＰＤＨ１、ＯＴＸ２、ＲＤＨ１２、ＴＵＬＰ１、ＣＲＢ１、ＭＴ－ＮＤ４、ＭＴ－ＮＤ１、ＭＴ－ＮＤ６、ＢＣＫＤＨＡ、ＢＣＫＤＨＢ、ＤＢＴ、ＭＭＡＢ、ＡＲＳＢ、ＧＵＳＢ、ＮＡＧＳ、ＮＰＣ１、ＮＰＣ２、ＮＤＰ、ＯＰＡ１、ＯＰＡ３、ＯＰＡ４、ＯＰＡ５、ＲＴＮ４ＩＰ１、ＴＭＥＭ１２６Ａ、ＯＰＡ６、ＯＰＡ８、ＡＣＯ２、ＰＡＨ、ＰＲＫＣＳＨ、ＳＥＣ６３、ＧＡＡ、ＵＲＯＳ、ＰＰＯＸ、ＨＰＸ、ＨＭＯＸ１、ＨＭＢＳ、ＭＩＲ２２３、ＣＹＰ１Ｂ１、ＬＴＢＰ２、ＡＧＸＴ、ＡＴＰ８Ｂ１、ＡＢＣＢ１１、ＡＢＣＢ４、ＦＥＣＨ、ＡＬＡＳ２、ＰＲＰＦ３１、ＲＰ１、ＥＹＳ、ＴＯＰＯＲＳ、ＵＳＨ２Ａ、ＣＮＧＡ１、Ｃ２ＯＲＦ７１、ＲＰ２、ＫＬＨＬ７、ＯＲＦ１、ＲＰ６、ＲＰ２４、ＲＰ３４、ＲＯＭ１、ＡＤＧＲＡ３、ＡＧＢＬ５、ＡＨＲ、ＡＲＨＧＥＦ１８、ＣＡ４、ＣＬＣＣ１、ＤＨＤＤＳ、ＥＭＣ１、ＦＡＭ１６１Ａ、ＨＧＳＮＡＴ、ＨＫ１、ＩＤＨ３Ｂ、ＫＩＡＡ１５４９、ＫＩＺ、ＭＡＫ、ＮＥＵＲＯＤ１、ＮＲＬ、ＰＤＥ６Ａ、ＰＤＥ６Ｇ、ＰＲＣＤ、ＰＲＰＦ３、ＰＲＰＦ４、ＰＲＰＦ６、ＰＲＰＦ８、ＲＢＰ３、ＲＥＥＰ６、ＳＡＭＤ１１、ＳＬＣ７Ａ１４、ＳＮＲＮＰ２００、ＳＰＰ２、ＺＮＦ５１３、ＮＥＫ２、ＮＥＫ４、ＮＸＮＬ１、ＯＦＤ１、ＲＰ１Ｌ１、ＲＰ２２、ＲＰ２９、ＲＰ３２、ＲＰ６３、ＲＰ９、ＲＧＲ、ＰＯＭＧＮＴ１、ＤＨＸ３８、ＡＲＬ３、ＣＯＬ２Ａ１、ＳＬＣＯ１Ｂ１、ＳＬＣＯ１Ｂ３、ＫＣＮＪ１３、ＴＩＭＰ３、ＥＬＯＶＬ４、ＴＦＲ２、ＦＡＨ、ＨＰＤ、ＭＹＯ７Ａ、ＣＤＨ２３、ＰＣＤＨ１５、ＤＦＮＢ３１、ＧＰＲ９８、ＵＳＨ１Ｃ、ＵＳＨ１Ｇ、ＣＩＢ２、ＣＬＲＮ１、ＨＡＲＳ、ＡＢＨＤ１２、ＡＤＧＲＶ１、ＡＲＳＧ、ＣＥＰ２５０、ＩＭＰＧ１、ＩＭＰＧ２、ＶＣＡＮ、Ｇ６ＰＣ１、ＡＴＰ７Ｂ及びそれらの任意の誘導体が含まれる。

【０１２１】

本明細書で使用されている場合、「レトロトランスポゾン」、「ジャンピング遺伝子」、「ジャンピング核酸」などの用語は、逆転写に依存する細胞の可動性遺伝子エレメントを指す。レトロトランスポゾンは、複製能力のない細胞起源のものであり、外来核酸配列を担持することができる。レトロトランスポゾンは、レトロウイルスの寄生体として作用し、長末端反復配列（ＬＴＲ）、レトロウイルスプライマー結合部位などの特定の古典的な特徴を保持することができる。しかしながら、天然に存在するレトロトランスポゾンは、複製能力のあるウイルスを生成するために正常に組換えが可能な機能的なレトロウイルス構造遺伝子を通常含有しない。一部のレトロトランスポゾンは、いわゆる「利己的ＤＮＡ」、又は遺伝情報の例であり、これは自己複製能力を除いて何もコードしない。レトロトランスポゾンは、宿主細胞内に時折存在するレトロウイルス又はレトロトランスポザーゼを利用することによってそうすることができ、ウイルス粒子内にそれ自体を効率的にパッケージングし、ウイルス粒子を新しい宿主ゲノムに輸送し、そこで再びＲＮＡとして発現される。そのＲＮＡ内にコードされた情報は、ジャンピング遺伝子と共に輸送される可能性がある。レトロトランスポゾンは、ＤＮＡトランスポゾン又はＬＴＲレトロトランスポゾン若しくは非ＬＴＲレトロトランスポゾンを含むレトロトランスポゾンであってもよい。

【０１２２】

非長末端反復配列（ＬＴＲ）レトロトランスポゾンは、真核生物のゲノムに広く存在する可動性遺伝子エレメントの一種である。それらは、２つのクラス：脱プリン塩基／脱ピリミジン塩基エンドヌクレアーゼ（ＡＰＥ）型及び制限酵素様エンドヌクレアーゼ（ＲＬＥ）型を含む。ＡＰＥクラスのレトロトランスポゾンは、２つの機能的ドメイン：エンドヌクレアーゼ／ＤＮＡ結合ドメイン及び逆転写酵素ドメインから構成される。ＲＬＥクラ

スは、３つの機能的ドメイン：ＤＮＡ結合ドメイン、逆転写ドメイン及びエンドヌクレアーゼドメインから構成される。非ＬＴＲレトロトランスポゾンの逆転写酵素ドメインは、ＲＮＡ配列鋳型に結合し、それを宿主ゲノムの標的ＤＮＡに逆転写することによって機能する。ＲＮＡ配列鋳型は、トランスポザーゼに特異的に結合している３’非翻訳領域、及び一般にトランスポザーゼタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム（「ＯＲＦ」）を有する可変５’領域を有する。ＲＮＡ配列鋳型はまた、レトロトランスポザーゼに特異的に結合する５’非翻訳領域を含み得る。一部の実施形態では、非ＬＴＲトランスポゾンには、Ｌ１などのＬＩＮＥレトロトランスポゾン、及びＡｌｕ配列などのＳＩＮＥレトロトランスポゾンが含まれ得る。他の例には、例えば、限定されないが、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｒ４及びＲ５レトロトランスポゾンが含まれる（Ｍｏｓｓ，Ｗ．Ｎ．ら、ＲＮＡ Ｂｉｏｌ．２０１１、８（５）、７１４～７１８頁；及びＢｕｒｋｅ，Ｗ．Ｄ．ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ２００３、２０（８）、１２６０～１２７０頁）。トランスポゾンは、自律的であってもよい又は非自律的であってもよい。

【０１２３】

レトロウイルスを含むＬＴＲレトロトランスポゾンは、典型的な哺乳動物ゲノムのかなりの割合を構成し、ヒトゲノムの約８％及びマウスゲノムの１０％を占める。Ｌａｎｄｅｒら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ ４０９、８６０～９２１頁；Ｗａｔｅｒｓｏｎら、２００２、Ｎａｔｕｒｅ ４２０、５２０～５６２頁。ＬＴＲエレメントは、レトロトランスポゾン、内因性レトロウイルス（ＥＲＶ）及びＳＩＮＥ－ＲなどのＨＥＲＶ起源を有する反復エレメントを含む。ＬＴＲレトロトランスポゾンは、２つの酵素：インテグラーゼ及びレトロトランスポザーゼをコードする領域に隣接する２つのＬＴＲ配列を含む。

【０１２４】

ＥＲＶは、古代の生殖細胞感染の残余物であるヒト内因性レトロウイルス（ＨＥＲＶ）を含む。ほとんどのＨＥＲＶプロウイルスは大規模な欠失及び変異を受けているが、一部はグリコシル化ｅｎｖタンパク質を含む機能タンパク質をコードするＯＲＦＳを保持している。ｅｎｖ遺伝子は、ＬＴＲエレメントが細胞と個体との間で広がる可能性を与える。実際に、ヒトでは３つの全てのオープンリーディングフレーム（ｐｏｌ、ｇａｇ及びｅｎｖ）が同定されており、証拠により、ＥＲＶが生殖系列において活性であることが示唆されている。例えば、Ｗａｎｇら、２０１０、Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．２０、１９～２７頁を参照のこと。さらに、ＨＥＲＶ－Ｋ（ＨＭＬ－２）グループを含む小数のファミリーが、ウイルス粒子を形成することが示されており、最近では明らかに無傷のプロウイルスがヒト集団のごく一部において発見されている。例えば、Ｂａｎｎｅｒｔ及びＫｕｒｔｈ、２００６、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．ＵＳＡ １０１、１４５７２～１４５７９頁を参照のこと。

【０１２５】

ＬＴＲレトロトランスポゾンは、ＤＮＡトランスポゾンにおいて観察されるＤＮＡ切断及びＤＮＡ鎖転移と同じステップを使用してゲノム内の新しい部位に挿入する。しかしながら、ＤＮＡトランスポゾンと対照的に、ＬＴＲレトロトランスポゾンの組換えは、ＲＮＡ中間体に関与する。ＬＴＲレトロトランスポゾンは、ヒトゲノムの約８％を構成する。例えば、Ｌａｎｄｅｒら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ ４０９、８６０～９２１頁；Ｈｕａ－Ｖａｎら、２０１１、Ｂｉｏｌ．Ｄｉｒ．６、１９頁を参照のこと。

【０１２６】

組込み部位

本開示は、標的ゲノム内への組込み部位の付加による部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物を提供する。組込み部位は、より詳細に以下で論じられている。

【０１２７】

本明細書で使用されている場合、「組込み部位」という用語は、目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列が挿入される標的ゲノム内の部位を指す。組込み部位の

例には、例えば、限定されないが、ｌｏｘ７１部位（配列番号１）、ａｔｔＢ部位（配列番号３及び配列番号４３）、ａｔｔＰ部位（配列番号４及び配列番号４４）、ａｔｔＬ部位（配列番号６７）、ａｔｔＲ部位（配列番号６８）、Ｖｏｘ部位（配列番号６９）、ＦＲＴ部位（配列番号７０）又は偽ａｔｔＰ部位（配列番号７８）が含まれる。組込み部位は、ヌクレアーゼ、ｇＲＮＡ及び／又は組込み酵素を使用して細胞のゲノム又はその断片に挿入され得る。組込み部位は、限定されないが、ＰＥ１、ＰＥ２及びＰＥ３などのプライムエディターを使用して細胞のゲノム内に挿入され得、組込み部位はｐｅｇＲＮＡ上に担持される。ｐｅｇＲＮＡは、当該技術分野において知られている任意の部位を標的とすることができる。ｐｅｇＲＮＡの標的にされる部位の例には、限定されないが、ＡＣＴＢ、ＳＵＰＴ１６Ｈ、ＳＲＲＭ２、ＮＯＬＣ１、ＤＥＰＤＣ４、ＮＥＳ、ＬＭＮＢ１、ＡＡＶＳ１遺伝子座、ＣＣ１０、ＣＦＴＲ、セルピナ１、ＡＢＣＡ４及びそれらの任意の誘導体が含まれる。相補的組込み部位は、外因性ＤＮＡ又はＲＮＡ内の目的の遺伝子又は目的の核酸配列に作動可能に連結され得る。一部の実施形態では、１つの組込み部位が標的ゲノムに付加される。一部の実施形態では、１つより多い組込み部位が標的ゲノムに付加される。

【０１２８】

目的の複数の遺伝子又は核酸を挿入するために、２つ以上の組込み部位が所望の位置に付加される。目的の核酸配列を含む複数のＤＮＡは、限定されないが、ａｔｔＢ及びａｔｔＰなどの組込み配列に対して直交して隣接する。組込み部位は、リコンビナーゼの認識部位又はヌクレオチド配列を有意に認識しない場合、「直交する」。したがって、リコンビナーゼの１つのａｔｔＢ部位は、異なるリコンビナーゼのａｔｔＢ部位と直交し得る。さらに、リコンビナーゼの一対のａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位は、同じリコンビナーゼによって認識される別の対のａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位と直交し得る。一対のリコンビナーゼは、互いのａｔｔＢ又はａｔｔＰ部位配列の認識がある場合、本明細書に定義されているように互いに直交しているとみなされる。

【０１２９】

同じリコンビナーゼ又は異なるリコンビナーゼによる組込み部位又は部位の対の認識の欠如は、約３０％未満であり得る。一部の実施形態では、同じリコンビナーゼ又は異なるリコンビナーゼによる組込み部位又は部位の対の認識の欠如は、約３０％未満、約２８％未満、約２６％未満、約２４％未満、約２２％未満、約２０％未満、約１８％未満、約１６％未満、約１４％未満、約１２％未満、約１０％未満、約８％未満、約６％未満、約４％未満、約２％未満、約１％未満、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲であり得る。クロストークは、約３０％未満であり得る。一部の実施形態では、クロストークは、約３０％未満、約２８％未満、約２６％未満、約２４％未満、約２２％未満、約２０％未満、約１８％未満、約１６％未満、約１４％未満、約１２％未満、約１０％未満、約８％未満、約６％未満、約４％未満、約２％未満、約１％未満、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲である。

【０１３０】

一部の実施形態では、ａｔｔＢ及び／又はａｔｔＰ部位配列は、中心ジヌクレオチド配列を含む。例えば、中心ジヌクレオチドは、ＧＴからＧＡに変更され得ること、及びａｔｔＢ／ａｔｔＰ部位を含有するＧＡのみが相互作用し、ＧＴを含有する配列と交差反応しないことが示されている。一部の実施形態では、中心ジヌクレオチドは、ＡＧ、ＡＣ、ＴＧ、ＴＣ、ＣＡ、ＣＴ、ＧＡ、ＡＡ、ＴＴ、ＣＣ、ＧＧ、ＡＴ、ＴＡ、ＧＣ、ＣＧ及びＧＴからなる群から選択される。

【０１３１】

本明細書で使用されている場合、「ａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位配列の対」などの用語は、同じ中心ジヌクレオチドを共有し、組換え可能なａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位配列を指す。これは、１つのセリンインテグラーゼの存在下で、６対もの数のこれらの直交するａｔｔ部位が組換え可能であることを意味する（ａｔｔＰＴＴはａｔｔＢＴＴと特異的に組換え、ａｔｔＰＴＣはａｔｔＢＴＣと特異的に組み換えるなどである）。

【０１３２】
一部の実施形態では、中心ジヌクレオチドは非パリンドロームである。一部の実施形態では、中心ジヌクレオチドはパリンドロームである。一部の実施形態では、ａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の対は、２つ以上の異なる核酸の指向性組込みを誘導するために、目的の遺伝子又は目的の核酸配列をコードする異なるＤＮＡにおいて使用される。
【０１３３】
以下の表３は、異なる中心ジヌクレオチド（ＣＤ）を有するａｔｔＢ部位配列及びａｔｔＰ部位配列の対の例を示す。
【０１３４】
【表３】
表3

対	attB	attP	CD
1	配列番号: 5	配列番号: 6	TT
2	配列番号: 7	配列番号: 8	AA
3	配列番号: 9	配列番号: 10	CC
4	配列番号: 11	配列番号: 12	GG
5	配列番号: 13	配列番号: 14	TG
6	配列番号: 15	配列番号: 16	GT
7	配列番号: 17	配列番号: 18	CT
8	配列番号: 19	配列番号: 20	CA
9	配列番号: 21	配列番号: 22	TC
10	配列番号: 23	配列番号: 24	GA
11	配列番号: 25	配列番号: 26	AG
12	配列番号: 27	配列番号: 28	AC
13	配列番号: 29	配列番号: 30	AT
14	配列番号: 31	配列番号: 32	GC
15	配列番号: 33	配列番号: 34	CG
16	配列番号: 35	配列番号: 36	TA

【０１３５】
ＰＡＳＴＥ
本開示は、ＰＡＳＴＥを使用した部位特異的遺伝子操作のための天然に存在しない又は操作されたシステム、方法及び組成物を提供する。ＰＡＳＴＥは、より詳細に以下で論じられている。
【０１３６】
本明細書に開示されている部位特異的遺伝子操作は、細胞のゲノム内へ目的の１つ以上の遺伝子又は目的の１つ以上の核酸配列を挿入するためである。一部の実施形態では、目的の遺伝子は、限定されないが、代謝性疾患、嚢胞性線維症、筋ジストロフィー、ヘモクロマトーシス、テイ・サックス病、ハンチントン病、先天性難聴、鎌状赤血球貧血、家族性高コレステロール血症、アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症、Ｘ連鎖ＳＣＩＤ（Ｘ－ＳＣＩＤ）及びウィスコット・アルドリッチ症候群（ＷＡＳ）などの遺伝性疾患に関与している変異遺伝子である。一部の実施形態では、目的の遺伝子又は目的の核酸配列は、限定されないが、遺伝子の発現を決定するためなどの遺伝子分析のための遺伝子の上流

又は下流のレポーター遺伝子であり得る。一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、ＧＦＰ鋳型（配列番号７６）又はガウシアルシフェラーゼ（Ｇ－ルシフェラーゼ）鋳型（配列番号７７）である。一部の実施形態では、目的の遺伝子又は目的の核酸配列は、植物における乾燥耐性、気候耐寒性、並びに収量の増加及び除草剤抵抗性を増強する遺伝子を挿入するために植物遺伝学において使用され得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子又は目的の核酸配列は、限定されないが、関節炎、乾癬、狼瘡、セリアック病、糸球体腎炎、肝炎及び炎症性腸疾患を含む免疫疾患を処置するために細胞内へのタンパク質（例えば、リソソーム酵素）、血液因子（例えば、第Ｉ因子、第ＩＩ因子、第Ｖ因子、第ＶＩＩ因子、第Ｘ因子、第ＸＩ因子、第ＸＩＩ因子又は第ＸＩＩＩ因子）、膜タンパク質、エクソン、細胞内タンパク質（例えば、細胞質タンパク質、核タンパク質、ミトコンドリアタンパク質又はリソソームタンパク質などの細胞小器官タンパク質）、細胞外タンパク質、構造タンパク質、シグナル伝達タンパク質、調節タンパク質、輸送タンパク質、感覚タンパク質、運動タンパク質、防御タンパク質又は貯蔵タンパク質、抗炎症シグナル伝達分子の部位特異的挿入のために使用され得る。

【０１３７】

挿入される遺伝子又は核酸のサイズは、約１ｂｐ～約５０，０００ｂｐまで変化し得る。一部の実施形態では、挿入される遺伝子又は核酸のサイズは、約１ｂｐ、１０ｂｐ、５０ｂｐ、１００ｂｐ、１５０ｂｐ、２００ｂｐ、２５０ｂｐ、３００ｂｐ、３５０ｂｐ、４００ｂｐ、６００ｂｐ、８００ｂｐ、１０００ｂｐ、１２００ｂｐ、１４００ｂｐ、１６００ｂｐ、１８００ｂｐ、２０００ｂｐ、２２００ｂｐ、２４００ｂｐ、２６００ｂｐ、２８００ｂｐ、３０００ｂｐ、３２００ｂｐ、３４００ｂｐ、３６００ｂｐ、３８００ｂｐ、４０００ｂｐ、４２００ｂｐ、４４００ｂｐ、４６００ｂｐ、４８００ｂｐ、５０００ｂｐ、５２００ｂｐ、５４００ｂｐ、５６００ｂｐ、５８００ｂｐ、６０００ｂｐ、６２００、６４００ｂｐ、６６００ｂｐ、６８００ｂｐ、７０００ｂｐ、７２００ｂｐ、７４００ｂｐ、７６００ｂｐ、７８００ｂｐ、８０００ｂｐ、８２００ｂｐ、８４００ｂｐ、８６００ｂｐ、８８００ｂｐ、９０００ｂｐ、９２００ｂｐ、９４００ｂｐ、９６００ｂｐ、９８００ｂｐ、１０，０００ｂｐ、１０，２００ｂｐ、１０，４００ｂｐ、１０，６００ｂｐ、１０，８００ｂｐ、１１，０００ｂｐ、１１，２００ｂｐ、１１，４００ｂｐ、１１，６００ｂｐ、１１，８００ｂｐ、１２，０００ｂｐ、１４，０００ｂｐ、１６，０００ｂｐ、１８，０００ｂｐ、２０，０００ｂｐ、３０，０００ｂｐ、４０，０００ｂｐ、５０，０００ｂｐ、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲であり得る。

【０１３８】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている目的の遺伝子又は目的の核酸配列を使用した部位特異的操作は、腫瘍標的化又は同種異系生成のためのＴ細胞及びＮＫの操作のためである。これらは、腫瘍特異性のための受容体又はＣＡＲ、抗ＰＤ１抗体、ＩＦＮ－ガンマ、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－１５、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＩＬ－１０などのサイトカイン及び免疫回避遺伝子の使用を伴い得る。

【０１３９】

本開示において、目的の遺伝子又は目的の核酸の部位特異的挿入は、部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）を通じて実施される。ＰＡＳＴＥを使用して目的の遺伝子又は目的の核酸を挿入するための成分は、例えば、限定されないが、ヌクレアーゼ、組込み部位を付加するｇＲＮＡ、組込み部位に相補的である又は関連する配列に連結されている遺伝子又は核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡ鎖、及び組込み酵素である。ＰＡＳＴＥを使用して目的の遺伝子又は目的の核酸を挿入するための成分は、例えば、限定されないが、プライムエディター発現、組込み部位を付加するｐｅｇＲＮＡ、ニッキングガイドＲＮＡ、組込み酵素（Ｃｒｅ又はセリンリコンビナーゼ）、遺伝子及び組込みシグナルと共に目的の遺伝子又は目的の核酸配列を含む導入遺伝子ベクターである。ヌクレアーゼ及びプライムエディターは、ゲノム内に組込み部位を組み込む。組込み酵素は、組込み部位に目的の遺伝子を組み込む。一部の実施形態では、遺伝子及び組込みシグ

ナルと共に目的の遺伝子又は核酸配列を含む導入遺伝子ベクターは、細菌ＤＮＡ配列を欠くＤＮＡミニサークルである。一部の実施形態では、トランスジェニックベクターは、真核生物又は原核生物ベクターである。

【０１４０】

本明細書で使用されている場合、「ベクター」又は「導入遺伝子ベクター」という用語は、所望のコード配列及び宿主生物内で作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切な核酸配列を含有する組換えＤＮＡ分子を指す。原核生物における発現に必要な核酸配列には、通常、例えば、限定されないが、プロモーター、オペレーター（任意選択的）、リボソーム結合部位及び／又は他の配列が含まれる。真核細胞は、一般に、プロモーター（構成的、誘導性又は組織特異的）、エンハンサー、並びに終結及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られているが、必要な発現を犠牲にすることなく一部のエレメントが欠失され、他のエレメントが付加されてもよい。トランスジェニックベクターは、リンカーを介して互いに連結されたＰＥ及び組込み酵素をコードし得る。リンカーは、切断可能なリンカーであってもよい。例えば、リンカーを介して互いに連結されたＰＥ及び組込み酵素をコードするトランスジェニックベクターは、配列番号７３を含むｐＣＭＶ　ＰＥ２　Ｐ２Ａ　Ｃｒｅである。一部の実施形態では、リンカーは、切断可能でないリンカーであってもよい。一部の実施形態では、ヌクレアーゼ、プライムエディター及び／又は組込み酵素は、異なるベクターにおいてコードされ得る。

【０１４１】

本開示の実施形態に従う、単一部位に目的の複数の遺伝子又は核酸配列を挿入する方法は、図１２に示されている。一部の実施形態では、多重化は、図１３に示されているように固有のｐｅｇＲＮＡを使用して複数の遺伝子座に目的の複数の遺伝子を挿入することを含む（Ｍｅｒｒｉｃｋ，Ｃ．Ａ．ら、ＡＣＳ　Ｓｙｎｔｈ．Ｂｉｏｌ．２０１８、７、２９９～３１０頁）。本明細書では「多重化」と称される、細胞ゲノム内への目的の複数の遺伝子又は目的の核酸の挿入は、第１の核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡの５’末端に相補的な５’組込み部位及び最後の核酸を含むＤＮＡ又はＲＮＡの３’末端に３’組込み部位を組入れることによって促進される。一部の実施形態では、多重化を使用して細胞ゲノム内に挿入される目的のゲノム又は目的のアミノ酸配列の数は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲であり得る。

【０１４２】

一部の実施形態では、多重化により、例えば、シグナル伝達カスケードの組込み、その補因子を伴う目的のタンパク質の過剰発現、腫瘍性状態において変異した複数の遺伝子の挿入、又はがんの処置のための複数のＣＡＲの挿入が可能になる。

【０１４３】

一部の実施形態では、組込み部位は、ｒＡＡＶ媒介核酸組込み、ＴＡＬＥＮＳ及びＺＦＮなどの非プライム編集法を使用してゲノム内に挿入され得る。多くの特有の性質により、ＡＡＶはヒト遺伝子治療のための有望なベクターとなっている（Ｍｕｚｙｃｚｋａ、ＣＵＲＲＥＮＴ　ＴＯＰＩＣＳ　ＩＮ　ＭＩＣＲＯＢＩＯＬＯＧＹ　ＡＮＤ　ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ、１５８：９７～１２９頁（１９９２））。他のウイルスベクターとは異なり、ＡＡＶは、既知のヒト疾患との関連は示されておらず、一般に病原性があるとは考えられていない。野生型ＡＡＶは、部位特異的な様式で宿主染色体に組込み可能である（Ｍ．Ｋｏｔｉｎら、ＰＲＯＣ．ＮＡＴＬ．ＡＣＡＤ．ＳＣＩ、ＵＳＡ、８７：２２１１～２２１５頁（１９９０）；Ｒ．Ｊ．Ｓａｍｕｌｓｋｉ、ＥＭＢＯ　１０（１２）：３９４１～３９５０頁（１９９１））。二本鎖ＤＮＡ切断を作製する代わりに、ＡＡＶは、ＤＮＡ修飾を達成するために内因性相同組換えを刺激する。さらに、ゲノム編集及び標的とされるＤＳＢを導入するための転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）及びジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）。ＴＡＬＥＮの特異性は、反復単位の１２位及び１３位に位置する２つの多型アミノ酸、いわゆる反復可変二残基（ｒｅｐｅａｔ　ｖａｒ

ｉａｂｌｅ　ｄｉｒｅｓｉｄｕｅ）（ＲＶＤ）から生じる。ＴＡＬＥＮはＦｏｋＩヌクレアーゼに連結しており、これはＤＮＡを所望の位置において切断する。ＺＦＮは、カスタム部位特異的ゲノム編集のための人工制限酵素である。ジンクフィンガー自体は転写因子であり、各フィンガーは３～４個の塩基を認識する。これらのフィンガーモジュールを混合して適合させることによって、研究者はどの配列を標的にするかをカスタマイズできる。

【０１４４】

本明細書で使用されている場合、宿主ゲノムの修飾のためのプラスミド、核酸又はタンパク質の細胞、組織又は器官内への「投与」、「導入すること」又は「送達」という用語は、インビボ、インビトロ又はエクスビボで行われ得るそのような投与、導入又は送達のための輸送を指す。遺伝子修飾のためのプラスミド、ＤＮＡ又はＲＮＡは、典型的に、化学的手段（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）又はリポフェクション）、物理的手段（エレクトロポレーション又はマイクロインジェクション）、感染（これは、典型的に、ウイルス（例えば、ＡＡＶ　Ｒｅｐ遺伝子を発現するバキュロウイルス）などの感染因子の導入を意味する）、形質導入（微生物学では、これは、ウイルスによる細胞の安定した感染、又はウイルス因子（例えば、バクテリオファージ）によるある微生物から別の微生物への遺伝物質の移入を指す）によって達成されるトランスフェクションによって細胞内に導入され得る。組換えポリペプチド、タンパク質又はオリゴヌクレオチドの発現のためのベクターは、細胞、組織、器官又は対象において物理的手段（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション又はリポフェクション）によって得ることができる。ベクターは、担体へのインビトロ、エクスビボ又はインビボ送達のために薬学的に許容される担体中でベクターを調製することによって送達され得る。

【０１４５】

本明細書で使用されている場合、「トランスフェクション」という用語は、細胞による外因性核酸分子の取り込みを指す。外因性核酸が細胞膜内に導入されると、細胞は「トランスフェクト」される。トランスフェクションは、単一トランスフェクション、共トランスフェクション又は複数のトランスフェクションであってもよい。多くのトランスフェクション技術が当該技術分野において一般に知られている。例えば、Ｇｒａｈａｍら（１９７３）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２：４５６頁を参照のこと。このような技術は、１つ以上の外因性核酸分子を適切な宿主細胞内に導入するために使用され得る。

【０１４６】

一部の実施形態では、外因性核酸分子及び／又は遺伝子編集のための他の成分は、単一トランスフェクションにおいて組み合わされ、送達される。他の実施形態では、外因性核酸分子及び／又は遺伝子編集のための他の成分は、単一トランスフェクションにおいて組み合わせられず、送達されない。一部の実施形態では、外因性核酸分子及び／又は遺伝子編集のための他の成分は、例えば、限定されないが、プライム編集ベクター、ｐｅｇＲＮＡを含有するランディング部位などのランディング部位、プライム編集を刺激するためのニッキングガイドなどのニッキングガイド、対応するインテグラーゼ又はリコンビナーゼのための発現ベクターなどの発現ベクター、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードするミニサークルＤＮＡカーゴなどのミニサークルＤＮＡカーゴ、それらのいずれかの誘導体及びそれらのいずれかの組合せを含むように単一トランスフェクションにおいて組み合わされ、送達される。一部の実施形態では、目的の遺伝子又は目的のアミノ酸配列は、リポソームを使用して導入され得る。一部の実施形態では、目的の遺伝子又は目的のアミノ酸配列は、適切なベクター、例えば、限定されないが、プラスミド及びウイルスベクターを使用して送達され得る。ウイルスベクターの例には、限定されないが、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レンチウイルス、アデノウイルス、他のウイルスベクター、それらの誘導体又はそれらの組合せが含まれる。タンパク質及び１つ以上のガイドＲＮＡは、１つ以上のベクター、例えば、プラスミド又はウイルスベクター内にパッケージングされ得る。一部の実施形態では、送達は、ナノ粒子又はエクソソームを介する。例えば、エクソソーム

は、ＲＮＡの送達に特に有用であり得る。

【０１４７】

一部の実施形態では、プライム編集は、少なくとも約１％、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約１５％、少なくとも約、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約３５％、少なくとも約４０％、少なくとも約４５％、又は少なくとも約５０％の効率でランディング部位を挿入する。一部の実施形態では、プライム編集は、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約１０％、約１１％、約１２％、約１３％、約１４％、約１５％、約１６％、約１７％、約１８％、約１９％、約２０％、約２１％、約２２％、約２３％、約２４％、約２５％、約２６％、約２７％、約２８％、約２９％、約３０％、約３１％、約３２％、約３３％、約３４％、約３５％、約３６％、約３７％、約３８％、約３９％、約４０％、約４１％、約４２％、約４３％、約４４％、約４５％、約４６％、約４７％、約４８％、約４９％、約５０％、又は端点としてこれらの値のいずれか２つから形成されるいずれかの範囲の効率でランディング部位を挿入する。

【０１４８】

配列

酵素、ガイド、組込み部位及びプラスミドの配列は、以下の表４に見出され得る。

【０１４９】

【表４】

表4

配列番号/ 説明/ 起源	配列
配列番号 ：1 Lox71 （人工配列）	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAACGGTA
配列番号 ：2 Lox66 （人工配列）	TACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
配列番号 ：3 attB （人工配列）	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG
配列番号 ：4 attP （人工配列）	CCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
配列番号 ：5 attB-TT （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGTTCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：6 attP-TT （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：7	GGCTTGTCGACGACGGCGAACTCCGTCGTCAGGATCAT

attB-AA （人工配列）	
配列番号 ：8 attP-AA （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGAACTCAGTGGTGTACGGTAC AAACCCA
配列番号 ：9 attB-CC （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGCCCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：10 attP-CC （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCCCTCAGTGGTGTACGGTACA AACCCA
配列番号 ：11 attB-GG （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGGGCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：12 attP-GG （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGGCTCAGTGGTGTACGGTAC AAACCCA
配列番号 ：13 attB-TG （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGTGCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：14 attP-TG （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTGCTCAGTGGTGTACGGTACA AACCCA
配列番号 ：15 attB-GT （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT

配列番号 ：16 attP-GT （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：17 attB-CT （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGCTCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：18 attP-CT （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：19 attB-CA （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGCACTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：20 attP-CA （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：21 attB-TC （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGTCCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：22 attP-TC （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTCCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：23 attB-GA （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGGACTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：24 attP-GA （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA

配列番号 ：25 attB-AG （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGAGCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：26 attP-AG （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGAGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：27 attB-AC （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGACCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：28 attP-AC （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGACCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：29 attB-AT （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGATCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：30 attP-AT （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGATCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：31 attB-GC （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGGCCTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 ：32 attP-GC （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGCCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 ：33 attB-CG （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGCGCTCCGTCGTCAGGATCAT

配列番号 : 34 attP-CG （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 : 35 attB-TA （人工配列）	GGCTTGTCGACGACGGCGTACTCCGTCGTCAGGATCAT
配列番号 : 36 attP-TA （人工配列）	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA
配列番号 : 37 C31-attB （人工配列）	TGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTACTCC
配列番号 : 38 C31-attP （人工配列）	GTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGGG
配列番号 : 39 R4-attB （人工配列）	GCGCCCAAGTTGCCCATGACCATGCCGAAGCAGTGGTAGAAGGGCACCGGCAGACAC
配列番号 : 40 R4-attP （人工配列）	AGGCATGTTCCCCAAAGCGATACCACTTGAAGCAGTGGTACTGCTTGTGGGTACACTCTGCGGGTGATGA
配列番号 : 41 BT1-attB （人工配列）	GTCCTTGACCAGGTTTTTGACGAAAGTGATCCAGATGATCCAGCTCCACACCCCGAACGC
配列番号 : 42 BT1-attP （人工配列）	GGTGCTGGGTTGTTGTCTCTGGACAGTGATCCATGGGAAACTACTCAGCACCACCAATGTTCC

配列番号：43 Bxb-attB （人工配列）	TCGGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGGGC
配列番号：44 Bxb-attP （人工配列）	GTCGTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCCGAC
配列番号：45 TG1-attB （人工配列）	GATCAGCTCCGCGGGCAAGACCTTCTCCTTCACGGGGTGGAAGGTC
配列番号：46 TG1-attP （人工配列）	TCAACCCCGTTCCAGCCCAACAGTGTTAGTCTTTGCTCTTACCCAGTTGGGCGGGATAGCCTGCCCG
配列番号：47 C1-attB （人工配列）	AACGATTTTCAAAGGATCACTGAATCAAAAGTATTGCTCATCCACGCGAAATTTTTC
配列番号：48 C1-attP （人工配列）	AATATTTTAGGTATATGATTTTGTTTATTAGTGTAAATAACACTATGTACCTAAAAT
配列番号：49 C370-attB （人工配列）	TGTAAAGGAGACTGATAATGGCATGTACAACTATACTCGTCGGTAAAAAGGCA
配列番号：50 C370-attP （人工配列）	TAAAAAAATACAGCGTTTTTCATGTACAACTATACTAGTTGTAGTGCCTAAA
配列番号：51 K38-attB （人工配列）	GAGCGCCGGATCAGGGAGTGGACGGCCTGGGAGCGCTACACGCTGTGGCTGCGGTC

配列番号：52 K38-attP （人工配列）	CCCTAATACGCAAGTCGATAACTCTCCTGGGAGCGTTGACAACTTGCGCACCCTGA
配列番号：53 RB-attB （人工配列）	TCTCGTGGTGGTGGAAGGTGTTGGTGCGGGGTTGGCCGTGGTCGAGGTGGGGTGGTGGTAGCCATTCG
配列番号：54 RV-attP （人工配列）	GCACAGGTGTAGTGTATCTCACAGGTCCACGGTTGGCCGTGGACTGCTGAAGAACATTCCACGCCAGGA
配列番号：55 SPBC-attB （人工配列）	AGTGCAGCATGTCATTAATATCAGTACAGATAAAGCTGTATCTCCTGTGAACACAATGGGTGCCA
配列番号：56 SPBC-attP （人工配列）	AAAGTAGTAAGTATCTTAAAAAACAGATAAAGCTGTATATTAAGATACTTACTAC
配列番号：57 TP901-attB （人工配列）	TGATAATTGCCAACACAATTAACATCTCAATCAAGGTAAATGCTTTTTCGTTTT
配列番号：58 TP901-attP （人工配列）	AATTGCGAGTTTTTATTTCGTTTATTTCAATTAAGGTAACTAAAAAACTCCTTT
配列番号：59 Wβ-attB （人工配列）	AAGGTAGCGTCAACGATAGGTGTAACTGTCGTGTTTGTAACGGTACTTCCAACAGCTGGCGTTTCAGT
配列番号：60 Wβ-attP （人工配列）	TAGTTTTAAAGTTGGTTATTAGTTACTGTGATATTTATCACGGTACCCAATAACCAATGAATATTTGA

配列番号：61 A118-attB （人工配列）	TGTAACTTTTTCGGATCAAGCTATGAAGGACGCAAAGAGGGAACTAAACACTTAATT
配列番号：62 A118-attP （人工配列）	TTGTTTAGTTCCTCGTTTTCTCTCGTTGGAAGAAGAAGAAACGAGAAACTAAAATTA
配列番号：63 BL3-attB （人工配列）	CAACCTGTTGACATGTTTCCACAGACAACTCACGTGGAGGTAGTCACGGCTTTTACGTTAGTT
配列番号：64 BL3-attP （人工配列）	GAGAATACTGTTGAACAATGAAAAACTAGGCATGTAGAAGTTGTTTGTGCACTAACTTTAA
配列番号：65 MR11-attB （人工配列）	ACAGGTCAACACATCGCAGTTATCGAACAATCTTCGAAAATGTATGGAGGCACTTGTATCAATATAGGATGTATACCTTCGAAGACACTTGTACATGATGGATTAGAAGGCAAATCCTTT
配列番号：66 MR11-attP （人工配列）	CAAAATAAAAAACATTGATTTTTATTAACTTCTTTTGTGCGGAACTACGAACAGTTCATTAATACGAAGTGTACAAACTTCCATACAAAAATAACCACGACAATTAAGACGTGGTTTCTA
配列番号：67 attL （人工配列）	ATTATTTCTCACCCTGA
配列番号：68 attR （人工配列）	ATCATCTCCCACCCGGA
配列番号：69 Vox （人工配列）	AATAGGTCTG AGAACGCCCA TTCTCAGACG TATT

配列番号 ：70 FRT （人工配列）	GAAGTTCCTATAC TTTCTAGA GAATAGGAACTTC
配列番号 ：71 Creリコンビナーゼ発現プラスミド （人工配列）	GGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATT TATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGG GGCGCGCGCCAGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGCGGGGGGGGGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCT ATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGC CTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCC GGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACG GCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCT TGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAG GGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGT GTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGC TGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGT GTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGG GGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCG TGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAA CCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTT CGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGC CGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG CCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCC CCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTG CCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCC CAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCC TCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGA AATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCT TCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTT CGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTT CCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCAT TTTGGCAAAGAATTCTGAGCCGCCACCATGGCCAATTTACTGACC GTACACCAAAATTTGCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGAT GAGGTTCGCAAGAACCTGATGGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCG TTTTCTGAGCATACCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGT GGGCGGCATGGTGCAAGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAG AACCTGAAGATGTTCGCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGG TCTGGCAGTAAAAACTATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACAT GCTTCATCGTCGGTCCGGGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGC TGTTTCACTGGTTATGCGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGC

10 20 30 40 50

CGGTGAACGTGCAAAACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTT
CGACCAGGTTCGTTCACTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGA
TATACGTAATCTGGCATTTCTGGGGATTGCTTATAACACCCTGTTA
CGTATAGCCGAAATTGCCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGT
ACTGACGGTGGGAGAATGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACG
CTGGTTAGCACCGCAGGTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTA
ACTAAACTGGTCGAGCGATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATG
ATCCGAATAACTACCTGTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTG
CCGCGCCATCTGCCACCAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAG
GGATTTTTGAAGCAACTCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATG
ACTCTGGTCAGAGATACCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTG
TCGGAGCCGCGCGAGATATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGG
AGATCATGCAAGCTGGTGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGA
ACTATATCCGTAACCTGGATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCC
TGCTGGAAGATGGCGATGGACCGGTGGAACAAAAACTTATTTCTG
AAGAAGATCTGTGATAGCGGCCGCACTCCTCAGGTGCAGGCTGCC
TATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAA
TACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCA
TGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTAT
TTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAA
GGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATT
TGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAA
CAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCC
TGCTGTCCATTCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAG
ATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA
AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTG
ACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCCCTC
GACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAT
AGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGT
TCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGC
AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTG
AGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAA
ATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCATTA
ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCG
CTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGG
CTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAA
AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGG
CGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCG
ACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT
ACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCC
GACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG
TGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT
TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC

	TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTT GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT GGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGT TTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCT CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATC AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCA TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACC CACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCA TCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG GTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCC AACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG CGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC CGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT ACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACT CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT CTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAA CTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC TCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC TCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTT CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGA ATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTC AATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATA CATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCG CACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG
配列番号：72 GFP-Lox66 Cre 発現プラスミド （人工配列）	AGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAA CAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGG CTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGAT GCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTG TCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGG CAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG CTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTAT TGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCATGTCATCTACACCTTGC TCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCT GCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAA ACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGT CGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGC CGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGA TCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTG GAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTG TGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTG CTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTA CGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT CTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACTCGAGATCCACTAGAGTGT GGCGGCCGCATTCTTATAATCAGCATCATGATGTGGTACCACATCA TGATGCTGATTACCCCCAACTGAGAGAACTCAAAGGTTACCCCAG TTGGGGCGGGCCCACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACA

AATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAAC
TCATCGAGCTCGAGATCTGGCGAAGGCGATGGGGGTCTTGAAGGC
GTGCTGGTACTCCACGATGCCCAGCTCGGTGTTGCTGTGCAGCTCC
TCCACGCGGCGGAAGGCGAACATGGGGCCCCCGTTCTGCAGGATG
CTGGGGTGGATGGCGCTCTTGAAGTGCATGTGGCTGTCCACCACG
AAGCTGTAGTAGCCGCCGTCGCGCAGGCTGAAGGTGCGGGCGAAG
CTGCCCACCAGCACGTTATCGCCCATGGGGTGCAGGTGCTCCACG
GTGGCGTTGCTGCGGATGATCTTGTCGGTGAAGATCACGCTGTCCT
CGGGGAAGCCGGTGCCCACCACCTTGAAGTCGCCGATCACGCGGC
CGGCCTCGTAGCGGTAGCTGAAGCTCACGTGCAGCACGCCGCCGT
CCTCGTACTTCTCGATGCGGGTGTTGGTGTAGCCGCCGTTGTTGAT
GGCGTGCAGGAAGGGGTTCTCGTAGCCGCTGGGGTAGGTGCCGAA
GTGGTAGAAGCCGTAGCCCATCACGTGGCTCAGCAGGTAGGGGCT
GAAGGTCAGGGCGCCTTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGGTCATGCGG
CCCTGCTCGGGGGTGCCCTCTCCGCCGCCCACCAGCTCGAACTCCA
CGCCGTTCAGGGTGCCGGTGATGCGGCACTCGATCTTCATGGCGG
GCATGGTGGCGACCGGTAGCGCTAGCGGCTTCGGATAACTTCGTA
TAGCATACATTATACGAACGGTAAGCGCTACCGCCGGCATACCCA
AGTGAAGTTGCTCGCAGCTTATAGTCGCGCCCGGGGAGCCCAAGG
GCACGCCCTGGCACCGCGGCCGCTGAGTCTCGACCATCATCATCA
TCATCATTGAGTTTATCTGGGATAACAGGGTAATGTCATCTAGGGA
TAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTATCTAGGGA
TAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTCATCTAGG
GATAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTATCTAGG
GATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTCATCTA
GGGATAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTATCTA
GGGATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTCATC
TAGGGATAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTATC
TAGGGATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTCA
TCTAGGGATAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGTA
TCTAGGGATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATGT
CATCTAGGGATAACAGGGTATGTCATCTGGGATAACAGGGTAATG
TATCTAGGGATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAGGGTAAT
GTCATCTAGGGATAACAGGGTAAATGTCATCTAGGGATAACAGGG
TAATGTCATCTAGGGATAACAGGGTAATGTCATCTGGGATAACAG
GGTAATGTCATCTAGGGATAACAGGGTAATGTATCGCCAGCGTCG
CACAGCATGTTTGCTTGTCGCCGTCGCGTCTGTCACATCTTTTCCG
CCAGCAGTTAGGGATTAGCGTCTTAAGCTGGCGCGAGGACCAACG
TATCAGCCAGGCGAAGCTGCTTTTGAGCACCACCCGGATGCCTAT
CGCCACCGTCGGTCGCAATGTTGGTTTTGACGATCAACTCTATTTC
TCGCGGGTATTTAAAAAATGCACCGGGGCCAGCCCGAGCGAGTTC
CGTGCCGGTTGTGAAGAAAAAGTGAATGATGTAGCCGTCAAGTTG
TCATAATTGGTAACGAATCAGACAATTGACGGCTTGACGGAGTAG
CATAGGGTTTGCAGAATCCCTGCTTCGTCCATTTGACAGGCACATT
ATGCATGCCGCTTCGCCTTCGCGCGCGAATTGATCTGCTGCCTCGC
GCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCC
GGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACA
AGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGC
AGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTT
AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATG
CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
AGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCG
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC

	GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAA AATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTG TTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT CGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCC CCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGA GTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT ATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT GGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGA TCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT GGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGCGGATACA TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAAGAGTTTGTAGAAAC GCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAATTTGATGCC TGGCAGTTTATGGCGGGCGTCCTGCCCGCCACCCTCCGGGCCGTTG CTTCGCAACGTTCAAATCCGCTCCCGGCGGATTTGTCCTACTCAGG AGAGCGTTCACCGACAAACAACAGATAAAACGAAAGGCCCAGTC TTTCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTTGATGCCTGGCAGTTCCCTACT CTCGCATGGGGAGACCCCACACTACCATCGGCGCTACGGCGTTTC ACTTCTGAGTTCGGCATGGGGTCAGGTGGGACCACCGCGCTACTG CCGCCAGGCAAATTCTGTTTTATCAGACCGCTTCTGCGTTCTGATT TAATCTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTCTCATCCGCCAAAACAGCC AAGCTGGAGACCGTTTGGCCCCCCTCGAGCACGTAGAAAGCCAGT CCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCT ATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGC TTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATG GACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAA GGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCC AAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCA
配列番号：73 pCMV PE2 P2A Cre プラスミド （人工配列）	ACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACT GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCC CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTC CACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAA TGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTG GTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGAGATCCGCGGCCGCTAATA CGACTCACTATAGGGAGAGCCGCCACCATGAAACGGACAGCCGAC GGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAGAAGCGGAAAGTCGACAA GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTG GGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAATTCAA

GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGAT
CGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCG
GCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGG
TGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCTGGTGG
AAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCG
TGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCATCTACCACC
TGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACT
TCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACA
AGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGG
AAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGT
CTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCC
AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCGGAAACCTGATTG
CCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACC
TGGCCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACG
ACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCG
ACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAG
CGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAG
CGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGAC
CCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAA
AGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACAT
TGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCC
CATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCT
GAACAGAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACG
GCAGCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTC
TGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGG
AAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGG
GCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAA
AGAGCGAGGAAACCATCACCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGG
ACAAGGGCGCTTCCGCCCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACT
TCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCC
TGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGA
AATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCG
AGCAGAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGA
AAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATC
GAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTC
AACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATTATCAAG
GACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGA
AGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGAT
CGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACCTGTTCGACGACAAAGT
GATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGC
TGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCA
AGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAA
ACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGG
ACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACG
AGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCA
TCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGG
GCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAG
AACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAAT
GAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCC
TGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAG
CTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGAC

CAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACGCT
ATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAG
GTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGT
GCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGC
AGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATC
TGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCC
GGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAG
CACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGAC
GAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAA
GTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAA
GTGCGCGAGATCAACAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTG
AACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTG
GAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGG
AAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGC
CAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAG
ATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAG
ACAAACGGCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGA
TTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCCCAAGTGAATAT
CGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGT
CTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAGA
AGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCG
TGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGT
CCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCA
TGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTTCTGGAAG
CCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGCTG
CCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATG
CTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTG
CCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGA
AGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTTG
TGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCA
GCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACA
AAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAG
AGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGG
GAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCGGA
AGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCC
ACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTC
AGCTGGGAGGTGACTCTGGAGGATCTAGCGGAGGATCCTCTGGCA
GCGAGACACCAGGAACAAGCGAGTCAGCAACACCAGAGAGCAGT
GGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCACCCTAAATATAGAAGATGA
GTATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTCTAGG
GTCCACATGGCTGTCTGATTTTCCTCAGGCCTGGGCGGAAACCGG
GGGCATGGGACTGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACCTCTG
AAAGCAACCTCTACCCCCGTGTCCATAAAACAATACCCCATGTCA
CAAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGACTGTTG
GACCAGGGAATACTGGTACCCTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCC
CTGCTACCCGTTAAGAAACCAGGGACTAATGATTATAGGCCTGTC
CAGGATCTGAGAGAAGTCAACAAGCGGGTGGAAGACATCCACCC
CACCGTGCCCAACCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCCACCGTCC
CACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCTTTTTCTGCC
TGAGACTCCACCCCACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGTGGAG
AGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAATTGACCTGGACCAGACT
CCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTAATGAGGCACT
GCACAGAGACCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGAT

	CCTGCTACAGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAG CTAGACTGCCAACAAGGTACTCGGGCCCTGTTACAAACCCTAGGG AACCTCGGGTATCGGGCCTCGGCCAAGAAAGCCCAAATTTGCCAG AAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAAGAGGGTCAGAGA TGGCTGACTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCTACT CCGAAGACCCCTCGACAACTAAGGGAGTTCCTAGGGAAGGCAGGC TTCTGTCGCCTCTTCATCCCTGGGTTTGCAGAAATGGCAGCCCCCC TGTACCCTCTCACCAAACCGGGGACTCTGTTTAATTGGGGCCCAGA CCAACAAAAGGCCTATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGC CCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTT GTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCCTAACGCAAAA ACTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAAGCT AGACCCAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGC AGCCATTGCCGTACTGACAAAGGATGCAGGCAAGCTAACCATGGG ACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCCATGCAGTAGAGGCACTAGT CAAACAACCCCCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCCGGATGACTCA CTATCAGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCGGACCG GTGGTAGCCCTGAACCCGGCTACGCTGCTCCCACTGCCTGAGGAA GGGCTGCAACACAACTGCCTTGATATCCTGGCCGAAGCCCACGGA ACCCGACCCGACCTAACGGACCAGCCGCTCCCAGACGCCGACCAC ACCTGGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCGT AAGGCGGGAGCTGCGGTGACCACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCT AAAGCCCTGCCAGCCGGGACATCCGCTCAGCGGGCTGAACTGATA GCACTCACCCAGGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAAT GTTTATACTGATAGCCGTTATGCTTTTGCTACTGCCCATATCCATG GAGAAATATACAGAAGGCGTGGGTGGCTCACATCAGAAGGCAAA GAGATCAAAAATAAAGACGAGATCTTGGCCCTACTAAAAGCCCTC TTTCTGCCCAAAAGACTTAGCATAATCCATTGTCCAGGACATCAAA AGGGACACAGCGCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGGCTGACCAA GCGGCCCGAAAGGCAGCCATCACAGAGACTCCAGACACCTCTACC CTCCTCATAGAAAATTCATCACCCTCTGGCGGCTCAAAAAGAACC GCCGACGGCAGCGAATTCGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCGG AAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGCGACGT GGAGGAGAACCCTGGACCTAATTTACTGACCGTACACCAAAATTT GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAGGTTCGCAAGAA CCTGATGGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCGTTTTCTGAGCATACC TGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGTCGTGGGCGGCATGGTGCA AGTTGAATAACCGGAAATGGTTTCCCGCAGAACCTGAAGATGTTC GCGATTATCTTCTATATCTTCAGGCGCGCGGTCTGGCAGTAAAAAC TATCCAGCAACATTTGGGCCAGCTAAACATGCTTCATCGTCGGTCC GGGCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATGCTGTTTCACTGGTTATG CGGCGGATCCGAAAAGAAAACGTTGATGCCGGTGAACGTGCAAA ACAGGCTCTAGCGTTCGAACGCACTGATTTCGACCAGGTTCGTTCA CTCATGGAAAATAGCGATCGCTGCCAGGATATACGTAATCTGGCA TTTCTGGGGATTGCTTATAACACCCTGTTACGTATAGCCGAAATTG CCAGGATCAGGGTTAAAGATATCTCACGTACTGACGGTGGGAGAA TGTTAATCCATATTGGCAGAACGAAAACGCTGGTTAGCACCGCAG GTGTAGAGAAGGCACTTAGCCTGGGGGTAACTAAACTGGTCGAGC GATGGATTTCCGTCTCTGGTGTAGCTGATGATCCGAATAACTACCT GTTTTGCCGGGTCAGAAAAAATGGTGTTGCCGCGCCATCTGCCAC CAGCCAGCTATCAACTCGCGCCCTGGAAGGGATTTTTGAAGCAAC TCATCGATTGATTTACGGCGCTAAGGATGACTCTGGTCAGAGATA CCTGGCCTGGTCTGGACACAGTGCCCGTGTCGGAGCCGCGCGAGA

TATGGCCCGCGCTGGAGTTTCAATACCGGAGATCATGCAAGCTGG
TGGCTGGACCAATGTAAATATTGTCATGAACTATATCCGTAACCTG
GATAGTGAAACAGGGGCAATGGTGCGCCTGCTGGAAGATGGCGAT
TAATTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA
GCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAA
GGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGAAAATTGCAT
CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCA
GCTGGGGCTCGATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAT
TCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTAGGG
TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAA
TCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTT
CCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCG
GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC
AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT
TCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCT
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
GCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT
GGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAG
GTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGC
CCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC
GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG
GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA
GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTAT
CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG
CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGA
AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAA
AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC
TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCT
AAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAT
CAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATA
GTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC
TTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGC
TCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGG
GCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGT
CTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTA
ATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTC
ACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGA
TCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
AGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAG
TGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGT
CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACC
AAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC
CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
AAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAA
GGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC
ACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGG

	TGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATAT TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT TTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCGACGGATCGGGAGATCGAT CTCCCGATCCCCTAGGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGC CGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTC GCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGC TTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTG CGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATAT
配列番号：74 +90 ngRNAガイド配列 （人工配列）	GTCAACCAGTATCCCGGTGC
配列番号：75 +90 ngRNA （人工配列）	GTCAACCAGTATCCCGGTGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGC
配列番号：76 GFPミニサークル鋳型（ミニサークルへの切断前） （人工配列）	TGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCGAGAAAGCCATCCA GTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCT GGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCCAGTCTAGCT ATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTTTGCGCT TGCGTTTTCCCTTGTCCAGATAGCCCAGTAGCTGACATTCATCCGG GGTCAGCACCGTTTCTGCGGACTGGCTTTCTACGTGCTCGAGGGGG GCCAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGAT TTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGAT AAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGA CCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAG TGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAA TAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCT GTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGG GAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGG GCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTT TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGACCAAAAT CCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT GCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTT TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTA GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG CGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG

TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTT
CGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTA
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
ATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGC
ATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGC
TACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTC
ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGC
GAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGC
AGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTC
TGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTT
TTTCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGC
ATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAA
CATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAA
GCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAAGAC
GCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGG
CGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATACATTACCCTGT
TATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTACCCTG
TTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCTAGATGACATTTACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATAAACTCAA
TGATGATGATGATGATGGTCGAGACTCAGCGGCCGCGGTGCCAGG
GCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGACTATAAGCTGCGAGCAAC
TTCACTTGGGTATGCCGGCGGTAGCGCTTACCGTTCGTATAATGTA
TGCTATACGAAGTTATCCGAAGCCGCTAGCGGTGGTTTGTCTGGTC
AACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCAGCTACCGG
TCGCCACCATGCCCGCCATGAAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCA
CCCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGGAGAGGGC
ACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAA
AGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGG
CTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCCAGCGGCTACGAGAA
CCCCTTCCTGCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCG
CATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGCTGCACGTGAGCTTCAG
CTACCGCTACGAGGCCGGCCGCGTGATCGGCGACTTCAAGGTGGT
GGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCGACAAGAT
CATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGA

	TAACGTGCTGGTGGGCAGCTTCGCCCGCACCTTCAGCCTGCGCGA CGGCGGCTACTACAGCTTCGTGGTGGACAGCCACATGCACTTCAA GAGCGCCATCCACCCCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCCATGTT CGCCTTCCGCCGCGTGGAGGAGCTGCACAGCAACACCGAGCTGGG CATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCCATCGCCTTCGCC AGATCTCGAGCTCGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCA GTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTA TTTGTGGGCCCGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTT GGGGGTAATCAGCATCATGATGTGGTACCACATCATGATGCTGAT TATAAGAATGCGGCCGCCACACTCTAGTGGATCTCGAGTTAATAA TTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCG AATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCC CATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCT ATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATG AATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAG GCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTC GCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGC TCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAG TACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCA GGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCATCAGCCAT GATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGTAGATGACATGGAGA TCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTT CAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGG CCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGCAGTTCATTCAGGGC ACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCTGCGC TGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTG TGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGA ACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCAT CCTGTCTCTTGATCAGAGCT
配列番号 ：77 ガウシアルシフェラーゼミニサークル鋳型 （人工配列）	TGATCCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCGAGAAAGCCATCCA GTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCT GGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGCCCAGTCTAGCT ATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTTTGCGCT TGCGTTTTCCCTTGTCCAGATAGCCCAGTAGCTGACATTCATCCGG GGTCAGCACCGTTTCTGCGGACTGGCTTTCTACGTGCTCGAGGGGG GCCAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGAT TTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGAT AAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGA CCCCATGCCGAACTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAG TGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAA TAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCT GTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGG GAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGG GCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTGTT TATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGACCAAAAT CCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAA AAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCT GCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTT TGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTA GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTC

GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGT
CGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCT
TGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC
TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG
TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA
GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTT
CGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGT
TCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTA
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG
ATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGA
GCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGC
ATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGC
TACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCG
CTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAG
ACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTC
ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGC
GAAGGCGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGC
AGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTC
TGATTCGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTACATCATTCACTT
TTTCTTCACAACCGGCACGGAACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGC
ATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAA
CATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAA
GCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAAGAC
GCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGG
CGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATACATTACCCTGT
TATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTACCCTG
TTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCTAGATGACATTTACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATTAC
CCTGTTATCCCTAGATACATTACCCTGTTATCCCAGATGACATACC
CTGTTATCCCTAGATGACATTACCCTGTTATCCCAGATAAACTCAA
TGATGATGATGATGATGGTCGAGACTCAGCGGCCGCGGTGCCAGG
GCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGACTATAAGCTGCGAGCAAC
TTCACTTGGGTATGCCGGCGGTAGCGCTTACCGTTCGTATAATGTA
TGCTATACGAAGTTATCCGAAGCCGCTAGCGGTGGTTTGTCTGGTC
AACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCACTACCGGT
CGCCACCATGGGAGTCAAAGTTCTGTTTGCCCTGATCTGCATCGCT
GTGGCCGAGGCCAAGCCCACCGAGAACAACGAAGACTTCAACATC
GTGGCCGTGGCCAGCAACTTCGCGACCACGGATCTCGATGCTGAC
CGCGGGAAGTTGCCCGGCAAGAAGCTGCCGCTGGAGGTGCTCAAA
GAGATGGAAGCCAATGCCCGGAAAGCTGGCTGCACCAGGGGCTGT

	CTGATCTGCCTGTCCCACATCAAGTGCACGCCCAAGATGAAGAAG TTCATCCCAGGACGCTGCCACACCTACGAAGGCGACAAAGAGTCC GCACAGGGCGGCATAGGCGAGGCGATCGTCGACATTCCTGAGATT CCTGGGTTCAAGGACTTGGAGCCCATGGAGCAGTTCATCGCACAG GTCGATCTGTGTGTGGACTGCACAACTGGCTGCCTCAAAGGGCTT GCCAACGTGCAGTGTTCTGACCTGCTCAAGAAGTGGCTGCCGCAA CGCTGTGCGACCTTTGCCAGCAAGATCCAGGGCCAGGTGGACAAG ATCAAGGGGGCCGGTGGTGACTAAGCGGAGCTCGATGAGTTTGGA CAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAA ATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTGGGCCCGCCCCAACTGGGGT AACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGGGTAATCAGCATCATGATGTGG TACCACATCATGATGCTGATTATAAGAATGCGGCCGCCACACTCT AGTGGATCTCGAGTTAATAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG ATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAA GCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAA TATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACAC CCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCA CCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGAT CCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGG CTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGAC AAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTC GCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGC CGCCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCA AGGTGTAGATGACATGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGCCCAATA GCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTG CGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCT CGTCTTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAA AAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCA TCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGC CTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTT CAATCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGAGCT
配列番号：78 偽attP部位 （人工配列）	CCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGTTCTCTCAGTTGGGG
配列番号：79 アルブミン-pegRNA-セルピン （人工配列）	GACTGAAACTTCACAGAATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCTTGGGATAGTTATGAATTCAATCTTCAACCCTATCCGGAT GATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTCTGT GAAGTTTCAGTCA
配列番号：80 アルブミン-pegRNA-CPS1 （人工配列）	GACTGAAACTTCACAGAATAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCTTGGGATAGTTATGAATTCAATCTTCAACCCTATCCGGAT GATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTCTGT GAAGTTTC

配列番号 ：81 34 bp lox71 pegRNA （人工配列）	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCTGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCATACCGT TCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCGTGCTCAGTCTG
配列番号 ：82 34 bp lox66 pegRNA （人工配列）	GGCCCAGACTGAGCACGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCTGGAGGAAGCAGGGCTTCCTTTCCTCTGCCATCAATAACT TCGTATAGCATACATTATACGAACGGTACGTGCTCAGTCTG
配列番号 ：83 gRNA （人工配列）	GGCCCAGACTGAGCACGTGA
配列番号 ：84 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 46 （オリジナルの長さ） pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCC TGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGA GAA
配列番号 ：85 TP901-1 最小 attB f pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_29_ （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCAT GGCACAATTAACATCTCAATCAAGGTAAATGCTTGAGCTGCGAG AA
配列番号 ：86 TP901-1 最小 attB rc pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_29_ （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCAT GGAGCATTTACCTTGATTGAGATGTTAATTGTGTGAGCTGCGAGA A
配列番号 ：87 PhiBT1 最小 attB f pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_29_ （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCAT GGCAGGTTTTTGACGAAAGTGATCCAGATGATCCAGTGAGCTGC GAGAA

配列番号：88 PhiBT1 最小 attB rc pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_29_ （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCTGGATCATCTGGATCACTTTCGTCAAAAACCTGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：89 ACTB N末端 ニッキングガイド 1 +48 ガイド （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
配列番号：90 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_18_RT_16_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：91 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_29_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAA
配列番号：92 ACTB N末端 PBS 13 RT 34 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCGACGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：93 ACTB N末端 PBS 13 RT 26 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA

配列番号：94 ACTB N末端 PBS 13 RT 23 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：95 ACTB N末端 PBS 13 RT 20 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：96 ACTB N末端 PBS 13 RT 16 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：97 ACTB N末端 PBS 18 RT 34 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCGACGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：98 ACTB N末端 PBS 18 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：99 ACTB N末端 PBS 18 RT 16 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：100 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 39 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTGCCCATCCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCGGAGA

配列番号：101 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 34 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCCATCCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCG GATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCC GGGCGGCGGAGA
配列番号：102 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGA TCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCG GCGGAGA
配列番号：103 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 24 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATCCTG ACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCGGA GA
配列番号：104 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 19 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATCCTGACGAC GGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCGGAGA
配列番号：105 LMNB1 N末端 PBS 18 RT 39 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCCTGCCCATCCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCA TGCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCC GGCCCGGGCGGCGGAGACAGCG
配列番号：106 LMNB1 N末端 PBS 18 RT 34 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCCATCCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCG GATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCC GGGCGGCGGAGACAGCG
配列番号：107 LMNB1 N末端 PBS 18 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATC CTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCG GAGACAGCG

配列番号：108 LMNB1 N末端 PBS 18 RT 24 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGGCACGGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATCCTG ACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCGGA GACAGCG
配列番号：109 LMNB1 N末端 PBS 18 RT 19 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATCCTGACGAC GGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCGGAGACAG CG
配列番号：110 LMNB1 N末端 ニッキングガイド 1 +46 （人工配列）	GCGTGGTGGGGCCGCCAGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGC
配列番号：111 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 42 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGGGATGATCCTG ACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：112 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 40 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGGATGATCCTGA CGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：113 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGATGATCCTGAC GACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：114 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 36 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTGATCCTGACG ACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCTGAGCTGCGAGAA

配列番号：115 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 44 pegRNA v2 （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCGGGCGGCGGAGA
配列番号：116 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 42 pegRNA v2 （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCGGGCGGCGGAGA
配列番号：117 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 40 pegRNA v2 （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGCGGGCGGCGGAGA
配列番号：118 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 38 pegRNA v2 （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCCGGGCGGCGGAGA
配列番号：119 NOLC1 N末端 PBS 18 RT 29 attB 46 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTCCTCCCAGGCAATACGCG
配列番号：120 NOLC1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 46 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCCCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTCCTCCAGGCAAT

配列番号：121 NOLC1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 44 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCCGGATGA TCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCTCCTCCA GGCAAT
配列番号：122 NOLC1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 42 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCGGATGAT CCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGTCCTCCAGG CAAT
配列番号：123 NOLC1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 40 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCGATGATC CTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGTCCTCCAGGCA AT
配列番号：124 NOLC1 N末端 PBS 13 RT 29 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCATGATCCT GACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCTCCTCCAGGCAAT
配列番号：125 NOLC1 ニッキングガイド - 43 （人工配列）	GAGCCGAGCACGAGGGGATACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGC
配列番号：126 ACTB N末端 PBS 13 RT 20 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGGCGATATCATCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAGAC CGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：127 ACTB N末端 PBS 13 RT 15 attB 38 pegRNA	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCTATCATCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCG TCGTCGACAAGCCTGAGCTGCGAGAA

（人工配列）	
配列番号：128 ACTB N末端 PBS 13 RT 10 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCTCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTC GACAAGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：129 ACTB N末端 PBS 9 RT 20 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGGCGATATCATCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAG ACCGCCGTCGTCGACAAGCCTGAGCTGCG
配列番号：130 ACTB N末端 PBS 9 RT 15 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCTATCATCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCG TCGTCGACAAGCCTGAGCTGCG
配列番号：131 ACTB N末端 PBS 9 RT 10 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCTCATCCATGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTC GACAAGCCTGAGCTGCG
配列番号：132 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 20 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCCGGGGGTCGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGA GACCGCCGTCGTCGACAAGCCCGGGCGGCGGAGA
配列番号：133 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 15 attB 38 pegRNA	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGTCGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGACCG CCGTCGTCGACAAGCCCGGGCGGCGGAGA

（人工配列）	
配列番号：134 LMNB1 N末端 PBS 13 RT 10 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTC GTCGACAAGCCCGGGCGGCGGAGA
配列番号：135 LMNB1 N末端 PBS 9 RT 20 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCCGGGGGTCGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGA CCGCCGTCGTCGACAAGCCCGGGCGGCG
配列番号：136 LMNB1 N末端 PBS 9 RT 15 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGTCGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGACCG CCGTCGTCGACAAGCCCGGGCGGCG
配列番号：137 LMNB1 N末端 PBS 9 RT 10 attB 38 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCAGTCGCCATGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGT CGACAAGCCCGGGCGGCG
配列番号：138 SUPT16H N末端 PBS 13 RT 24 Bxb1-GT_初期長 （人工配列）	GAGAAGCGGCGTCCGGGGCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCTCTTTGTCCAGAGTCACAGCCATACCGGATGATCCTGAC GACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCCCCGGACGCCGC
配列番号：139 SRRM2 N末端 PBS 13 RT 24 Bxb1 初期長	GGGCACGGGGCCATGTACAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA GTCGGTGCGGCGTCGGCAGCCCGATCCCGTTGCCGGATGATCCT GACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTACATGGCCC CGT

（人工配列）	
配列番号 ：140 DEPDC4 N末端 PBS 18 RT 24 Bxb1 初期長 （人工配列）	GTGTCAGGTGGGGCGGGGCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGCGCTGGCTCCTCCCCTGGCACCATACCGGATGATCCT GACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCCCCGCCCCA CCTGACAC
配列番号：141 NES N末端 PBS 13 RT 29 Bxb1 初期長 （人工配列）	GAGTGGGTCAGACGAGCAGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGCGATGGAGGGCTGCATGGGGGAGGAGTCGCCGGATGATC CTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGCTCGTCT GACC
配列番号 ：142 SUPT16H ニッキングガイド -53 （人工配列）	GCAGCCACCCGCTCTCGGCCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGC
配列番号：143 SRRM2 N末端 ニッキングガイド 1 +87 （人工配列）	GTGTAGTCAGGCCGCTCACCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGC
配列番号：144 DEPDC4 N末端 ニッキングガイド 1 +59 （人工配列）	GCTGACAAGTCTACGGAACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG AGTCGGTGC
配列番号：145 NES N末端 ニッキングガイド 2 +79 （人工配列）	GCTCCTCCAGCGCCTTGACCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGC

配列番号：146 HITI_ACTB_ガイド （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCA
配列番号：147 HITI_SUPTH16_ ガイド （人工配列）	AGAAGCGGCGTCCGGGGCTA
配列番号：148 HITI_SRRM2_ガイド （人工配列）	GGGCACGGGGCCATGTACAA
配列番号：149 HITI_NOLC1_ガイド （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGG
配列番号：150 HITI_DEPDC4_ ガイド （人工配列）	TGTCAGGTGGGGCGGGGCTA
配列番号：151 HITI_NES_ガイド （人工配列）	AGTGGGTCAGACGAGCAGGA
配列番号：152 HITI_LMNB1_ガイド （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCA

配列番号：153 HDR Cas9 ACTB ガイド （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG TCGGTGC
配列番号：154 ジヌクレオチドのためのACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB オリジナルの長さ pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCC TGACGACGGAG**XX**CGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGA GAA **XX**: CG, GC, AT, TA, GG, TT, GA, AG, CC, TC, CT, AA, TG, GT, CA, 又は AC
配列番号：155 融合のためのattB 46 GTを有するACTB N末端 PBS 13 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGCCGGATGATCCT GACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAG AA
配列番号：156 多重化のためのattB 46 CTを有するACTB N末端 PBS 13 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC GGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGCCGGATGATCCT GACGACGGAGAGCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGA GAA
配列番号：157 多重化のためのattB 46 GAを有するNOLC1 N末端 PBS 18 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCGTATTGCCTGGAGGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCGAACCACGCGGCGAATGCCGGCGTCCGCCCCGGATGATC CTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTCCTCCAGG CAATACGCG
配列番号：158 多重化のためのattB 46 AGを有するLMNB1 N末端 PBS 18 RT 29 pegRNA （人工配列）	GCTGTCTCCGCCGCCCGCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT CGGTGCGCGGCGGCACGGGGGTCGCAGTCGCCATGCCGGATGATC CTGACGACGGAGCTCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCGGGCGGCG GAGACAGCG

配列番号：159 EMX1 Cas9 ガイド 1 （人工配列）	GTCACCTCCAATGACTAGGG
配列番号：160 EMX1 Cas9 ガイド 2 （人工配列）	GGGCAACCACAAACCCACGA
配列番号：161 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 56 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCTATGCCGGATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCTAGCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：162 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 51 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTGCCGGATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCCTATGAGCTGCGAGAA
配列番号：163 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 46 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCGGATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCCTGAGCTGCGAGAA
配列番号：164 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 41 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGGGATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：165 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 36 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCTGAGCTGCGAGAA

配列番号：166 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 31 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACATGAGCTGCGAGAA
配列番号：167 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 26 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：168 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 21 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：169 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 16 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGACGACGGAGTCCGCCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：170 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 11 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGGACGGAGTCCGTGAGCTGCGAGAA
配列番号：171 ACTB N末端 PBS 13 RT 29 attB 6 GA pegRNA （人工配列）	GCTATTCTCGCAGCTCACCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGCGGAGTTGAGCTGCGAGAA

配列番号：172 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_18_RT_34_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCGACGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：173 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_18_RT_29_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAATAGCC
配列番号：174 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_34_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTCGACGACGAGCGCGGCGATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAA
配列番号：175 _L ox71_Cre pegRNAを有するACTB N末端 PBS_13_RT_16_ （人工配列）	GAAGCCGGCCTTGCACATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCATATCATCATCCATGGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAGCTGCGAGAA
配列番号：176 ACTB N末端 ニッキングガイド 2 +93 ガイド （人工配列）	CCCCACGATGGAGGGGAAGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
配列番号：177 LMNB1 N末端 ニッキングガイド 2 +87 ガイド （人工配列）	CCTTCTCCTGGAGCCGCGACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC

【０１５０】

挿入部位の配列は、以下の表４に見出され得る。

【０１５１】

【表５】

表4

説明/起源	フォワード配列 (5'-3')		リバース配列 (5'-3')	
	配列番号	配列	配列番号	配列
Bxb1_attP_GT_オリジナル_部位 （人工配列）	178	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	179	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGACCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_CG_部位 （人工配列）	180	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	181	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGCGCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_GC_部位 （人工配列）	182	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGCCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	183	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGGCCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_AT_部位 （人工配列）	184	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGATCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	185	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGATCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_TA_部位 （人工配列）	186	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	187	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGTACGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC

Bxb1_attP_GG_部位 （人工配列）	188	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	189	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGCCCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_TT_部位 （人工配列）	190	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	191	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGAACGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_GA_部位 （人工配列）	192	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGGACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	193	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGTCCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_AG_部位 （人工配列）	194	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGAGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	195	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGCTCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_CC_部位 （人工配列）	196	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCCCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	197	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGGGCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_TC_部位 （人工配列）	198	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTCCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	199	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGGACGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_CT_部位 （人工配列）	200	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCTCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	201	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGAGCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC

Bxb1_attP_AA_部位 （人工配列）	202	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGAACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	203	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGTTCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_CA_部位 （人工配列）	204	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGCACTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	205	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGTGCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_AC_部位 （人工配列）	206	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGACCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	207	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGGTCGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attP_TG_部位 （人工配列）	208	GTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCGTGCTCAGTGGTGTACGGTACAAACCCA	209	TGGGTTTGTACCGTACACCACTGAGCACGCGGTGGTTGACCAGACAAACCAC
Bxb1_attB_46_GT_オリジナル_部位 （人工配列）	210	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	211	CCGGATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_AA_部位 （人工配列）	212	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGAACTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	213	CCGGATGATCCTGACGACGGAGTTCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_GA_部位 （人工配列）	214	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGACTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	215	CCGGATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC

Bxb1_attB_46_CA_部位 （人工配列）	216	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGCACTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	217	CCGGATGATCCTGACGACGGAGTGCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_TA_部位 （人工配列）	218	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGTACTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	219	CCGGATGATCCTGACGACGGAGTACGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_AG_部位 （人工配列）	220	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGAGCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	221	CCGGATGATCCTGACGACGGAGCTCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_GG_部位 （人工配列）	222	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGGCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	223	CCGGATGATCCTGACGACGGAGCCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_CG_部位 （人工配列）	224	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGCGCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	225	CCGGATGATCCTGACGACGGAGCGCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_TG_部位 （人工配列）	226	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGTGCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	227	CCGGATGATCCTGACGACGGAGCACGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_AC_部位 （人工配列）	228	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGACCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	229	CCGGATGATCCTGACGACGGAGGTCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC

Bxb1_attB_46_GC_部位 （人工配列）	230	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGGCCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	231	CCGGATGATCCTGACGACGGAGGCCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_CC_部位 （人工配列）	232	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGCCCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	233	CCGGATGATCCTGACGACGGAGGGCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_TC_部位 （人工配列）	234	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGTCCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	235	CCGGATGATCCTGACGACGGAGGACGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_AT_部位 （人工配列）	236	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGATCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	237	CCGGATGATCCTGACGACGGAGATCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_CT_部位 （人工配列）	238	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGCTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	239	CCGGATGATCCTGACGACGGAGAGCGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_46_TT_部位 （人工配列）	240	GGCCGGCTTGTCGACGACGGCGTTCTCCGTCGTCAGGATCATCCGG	241	CCGGATGATCCTGACGACGGAGAACGCCGTCGTCGACAAGCCGGCC
Bxb1_attB_38_GT_部位 （人工配列）	242	GGCTTGTCGACGACGGCGGTCTCCGTCGTCAGGATCAT	243	ATGATCCTGACGACGGAGACCGCCGTCGTCGACAAGCC

Bxb1_attB_38_AA_部位 （人工配列）	244	GGCTTGTCGACGACGGCGAACTCCGTCGTCAGGATCAT	245	ATGATCCTGACGACGGAGTTCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_GA_部位 （人工配列）	246	GGCTTGTCGACGACGGCGGACTCCGTCGTCAGGATCAT	247	ATGATCCTGACGACGGAGTCCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_CA_部位 （人工配列）	248	GGCTTGTCGACGACGGCGCACTCCGTCGTCAGGATCAT	249	ATGATCCTGACGACGGAGTGCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_TA_部位 （人工配列）	250	GGCTTGTCGACGACGGCGTACTCCGTCGTCAGGATCAT	251	ATGATCCTGACGACGGAGTACGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_AG_部位 （人工配列）	252	GGCTTGTCGACGACGGCGAGCTCCGTCGTCAGGATCAT	253	ATGATCCTGACGACGGAGCTCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_GG_部位 （人工配列）	254	GGCTTGTCGACGACGGCGGGCTCCGTCGTCAGGATCAT	255	ATGATCCTGACGACGGAGCCCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_CG_部位 （人工配列）	256	GGCTTGTCGACGACGGCGCGCTCCGTCGTCAGGATCAT	257	ATGATCCTGACGACGGAGCGCGCCGTCGTCGACAAGCC

Bxb1_attB_38_TG_部位 （人工配列）	258	GGCTTGTCGACGACGGCGTGCTCCGTCGTCAGGATCAT	259	ATGATCCTGACGACGGAGCACGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_AC_部位 （人工配列）	260	GGCTTGTCGACGACGGCGACCTCCGTCGTCAGGATCAT	261	ATGATCCTGACGACGGAGGTCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_GC_部位 （人工配列）	262	GGCTTGTCGACGACGGCGGCCTCCGTCGTCAGGATCAT	263	ATGATCCTGACGACGGAGGCCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_CC_部位 （人工配列）	264	GGCTTGTCGACGACGGCGCCCTCCGTCGTCAGGATCAT	265	ATGATCCTGACGACGGAGGGCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_TC_部位 （人工配列）	266	GGCTTGTCGACGACGGCGTCCTCCGTCGTCAGGATCAT	267	ATGATCCTGACGACGGAGGACGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_AT_部位 （人工配列）	268	GGCTTGTCGACGACGGCGATCTCCGTCGTCAGGATCAT	269	ATGATCCTGACGACGGAGATCGCCGTCGTCGACAAGCC
Bxb1_attB_38_CT_部位 （人工配列）	270	GGCTTGTCGACGACGGCGCTCTCCGTCGTCAGGATCAT	271	ATGATCCTGACGACGGAGAGCGCCGTCGTCGACAAGCC

Bxb1_attB_38_TT_部位 （人工配列）	272	GGCTTGTCGACGAC GGCGTTCTCCGTCGT CAGGATCAT	273	ATGATCCTGACGAC GGAGAACGCCGTCG TCGACAAGCC
Cre Lox 66 部位 （人工配列）	274	TACCGTTCGTATAAT GTATGCTATACGAA GTTAT	275	ATAACTTCGTATAGC ATACATTATACGAA CGGTA
Cre Lox 71 部位 （人工配列）	276	ATAACTTCGTATAAT GTATGCTATACGAA CGGTA	277	TACCGTTCGTATAGC ATACATTATACGAA GTTAT
TP901-1 最小 attB 部位 （人工配列）	278	TTTACCTTGATTGAG ATGTTAATTGTG	279	CACAATTAACATCTC AATCAAGGTAAA
TP901-1 最小 attP 部位 （人工配列）	280	GCGAGTTTTTATTTC GTTTATTTCAATTAA GGTAACTAAAAAAC TCCTTT	281	AAAGGAGTTTTTTAG TTACCTTAATTGAAA TAAACGAAATAAAA ACTCGC
PhiBT1 最小 attB 部位 （人工配列）	282	CTGGATCATCTGGAT CACTTTCGTCAAAAA CCTG	283	CAGGTTTTTGACGAA AGTGATCCAGATGA TCCAG
PhiBT1 最小 attP 部位 （人工配列）	284	TTCGGGTGCTGGGTT GTTGTCTCTGGACAG TGATCCATGGGAAA CTACTCAGCACCA	285	TGGTGCTGAGTAGTT TCCCATGGATCACTG TCCAGAGACAACAA CCCAGCACCCGAA

【０１５２】

ＢｘｂｌおよびＲＴ変異体の配列は、以下の表６に見出され得る。

【０１５３】

【表６】

表6

配列番号/ 説明/ 起源	フォワード配列(5'-3')
配列番号：286 Bxb1_mut_V368A （人工配列）	AAAAGTGTGGGCTGCAGGATCTGA
配列番号：287 Bxb1_mut_E379A （人工配列）	GGAGCTGGCAGCTGTCAATGCC
配列番号：288 Bxb1_mut_E383A （人工配列）	AGTCAATGCCGCTCTCGTGGA
配列番号：403 RT_mut_L139P （人工配列）	TTGAGCGGGCCCCCACCGT
配列番号：289 RT_mut_E562Q （人工配列）	CAGCGGGCTCAGCTGATAGCA
配列番号：290 RT_mut_D653N （人工配列）	CGGATGGCTAACCAAGCGGCC

配列番号：404 RT(1-478)_Sto7d 融合	atgactcactatcaggccttgcttttggacacggaccgggtccagttcggaccggtggtagccctgaaccc ggctacgctgctcccactgcctgaggaagggctgcaacacaactgccttgatGGGACAGGTGG CGGTGGTGTCACCGTCAAGTTCAAGTACAAGGGTGAGGAACTT GAAGTTGATATTAGCAAAATCAAGAAGGTTTGGCGCGTTGGTA AAATGATATCTTTTACTTATGACGACAACGGCAAGACAGGTAG AGGGGCAGTGTCTGAGAAAGACGCCCCCAAGGAGCTGTTGCAA ATGTTGGAAAAGTCTGGGAAAAAGtctggcggctcaaaaagaaccgccgacgg cagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtc

【０１５４】
ｄｄＰＣＲ読み出しに使用されるプライマー、プローブ及び制限酵素の配列は、以下の表７に見出され得る。
【０１５５】
【表７】
表7

遺伝子座	カーゴ	配列番号	フォワードプライマー	配列番号	リバースプライマー	プローブ	配列番号	制限酵素
ACTB	GFP (pDY0186)	291	CCCG GCTTC CTTTG TCC	292	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/C C GGC TTG T/ZEN/ C GAC GAC GGC G/3IABkFQ/	405	Eco91I, HindIII
ACTB	TP90-1 GFP (pDY0333)	293	CCCG GCTTC CTTTG TCC	294	AACC ACAA CTAG AATG CAGT GA	/56-FAM/T G CTA TTG C/ZEN/ T TTA TTT GTG GGC CCG /3IABkFQ/	406	なし

ACTB	TP90-1 rc GFP (pDY0334)	295	CCCG GCTTC CTTTG TCC	296	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	なし
ACTB	PhiBT1 GFP (pDY0367)	297	CCCG GCTTC CTTTG TCC	298	AACC ACAA CTAG AATG CAGT GA	/56-FAM/T G CTA TTG C/ZEN/ T TTA TTT GTG GGC CCG /3IABk FQ/	406	なし
ACTB	PhiBT1 rc GFP (pDY0368)	299	CCCG GCTTC CTTTG TCC	300	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	なし
LMNB1	GFP (pDY0186)	301	TCCTT ATCA CGGT CCCG CTCG	302	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I	407	Eco91I, HindIII

						ABkFQ/		
NOLC1	GFP (pDY0186)	303	CGTCGACAACGGTAGTG	304	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CC ATG AAG A/ZEN/T CGA GTG CCG CAT CA/3IABkFQ/	407	Eco91I, HindIII
SUPT16 H	GFP (pDY0186)	305	TCGCGTGATTCTCGGAAC	306	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CC ATG AAG A/ZEN/T CGA GTG CCG CAT CA/3IABkFQ/	407	Eco91I, HindIII
SRRM2	GFP (pDY0186)	307	GGGCGGTAAGTGGTTAGTTT	308	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CC ATG AAG A/ZEN/T CGA GTG CCG CAT CA/3IABkFQ/	407	Eco91I, HindIII
DEPDC4	GFP (pDY0186)	309	AAGAGGCGGAGCCAGTA	310	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CC ATG AAG A/ZEN/T	407	Eco91I, HindIII

						CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/		
NES	GFP (pDY01 86)	311	CTCCC TTCTC CCGG TGCCC	312	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/C C GGC TTG T/ZEN/ C GAC GAC GGC G/3IAB kFQ/	405	Eco91I, HindIII
ACTB	ACTB HITI 鋳型 GFP (pDY02 19)	313	CCCG GCTTC CTTTG TCC	314	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	Eco91I
SRRM2	SRRM2 HITI 鋳型 GFP (aRY01 82_A2)	315	GGGC GGTA AGTG GTTA GTTT	316	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	Eco91I
NOLC1	NOLC1 HITI 鋳型 GFP (aRY01 82_A3)	317	CGTC GACA ACGG TAGT G	318	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T	407	Eco91I

						CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/		
DEPDC 4	DEPDC 4 HITI 鋳型 GFP (aRY01 82_A5)	319	AAGA GGCG GAGC CAGT A	320	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	Eco91I
NES	NES HITI 鋳型 GFP (aRY01 82_A7)	321	CTCCC TTCTC CCGG TGCCC	322	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	Eco91I
LMNB 1	LMNB 1 HITI 鋳型 GFP (aRY01 82_A4)	323	TCCTT ATCA CGGT CCCG CTCG	324	GAAC TCCAC GCCG TTCA	/56-FAM/ CC ATG AAG A/ZE N/T CGA GTG CCG CAT CA/3I ABkF Q/	407	Eco91I

ACTB	SERPINA (pDY0298)	325	CCCGGCTTCCTTTGTCC	326	GGCCTGCCAGCAGGAGGA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	EcoRI, XhoI, HindIII
ACTB	CPS1 (pDY299)	327	CCCGGCTTCCTTTGTCC	328	GGTGTGCAGTCACATTGGTAAAGCC	/56-FAM/ACAGCTTTC/ZEN/AAAGTGGTGAGGACAC T/3IABkFQ/	408	XhoI, HindIII
ACTB	CFTR (pDY0373)	329	CCCGGCTTCCTTTGTCC	330	GATGGGTCTAGTCCAGCTAAAG	/56-FAM/TACGGTACA/ZEN/AACCCACCCGAGAG A/3IABkFQ/	409	Eco91I, HindIII
ACTB	NYESOTRAC (pDY0318)	331	CCCGGCTTCCTTTGTCC	332	GAGAGACAAGGCTGCACA	/56-FAM/TACGGTACA/ZEN/AACCCACCCGAGA/3I	409	Eco47III, HindIII

						ABkFQ/		
NC_000003	GFP (pDY0186)	333	CCAGGTGAGAGTCAGGGTAGTGTTCA	334	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I, HindIII
NC_000002	GFP (pDY0186)	335	AGGGACCTTTGCCTGTGTGAGTC	336	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I, HindIII
NC_000009	GFP (pDY0186)	337	TCAGCTCTGTGCTGAGGCGAA	338	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I, HindIII
chr6:1490 45959	GFP (pDY0186)	339	AAGCCATCTCCCAGAATATCTGCTTAG	340	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/C	405	Eco91I, HindIII

			AAATG			GACGACGGCG/3IABkFQ/		
chr16:18607730	GFP (pDY0186)	341	GAGAGGAGCAACAGTGAGCATGATG	342	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I, HindIII
chr6:1490 45959	ACTB HITI 鋳型 GFP (pDY0219)	343	AAGCCATCTCCCAGAATATCTGCTTAGAAATG	344	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I
chr16:18607730	ACTB HITI 鋳型 GFP (pDY0219)	345	GAGAGGAGCAACAGTGAGCATGATG	346	GAACTCCACGCCGTTCA	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/CGACGACGGCG/3IABkFQ/	405	Eco91I
ACTB	CAG_Kozak_bGH_治療_遺伝子ジェネリックミニサークル	347	CCCGGCTTCCTTTGTCC	348	GGCTATGAACTAATGACCCCGT	/56-FAM/CCGGCTTGT/ZEN/C	405	Eco91I, HindIII

						GAC GAC GGC G/3I ABkF Q/		
ACTB	Hibit-セルピナ (pDY0405)	349	CCCG GCTTC CTTTG TCC	350	GGCC TGCC AGCA GGAG GA	/56-FAM/ CC GGC TTG T/ZE N/C GAC GAC GGC G/3I ABkF Q/	405	EcoRI, XhoI, HindIII
ACTB	Hibit-CPS1 (pDY406)	351	CCCG GCTTC CTTTG TCC	352	GGTG TGCA GTCA CATTG GTAA AGCC	/56-FAM/ AC AGC TTT C/ZE N/A AAG TGG TGA GGA CAC T/3IA BkFQ /	408	XhoI, HindIII

【０１５６】

ＮＧＳ読み出しのために使用されるプライマーの配列は、以下の表８に見出され得る。

【０１５７】

【表８】

表8

配列番号/ 説明/ 起源	ID	配列 (5'-3')
配列番号：353 N末端 ACTB Tn5 読み出し F 1 （人工配列）	PD0966	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCGAC CTCGGC TCACAGCG

配列番号：354 N末端 ACTB Tn5 読み出し F 2 （人工配列）	PD0967	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCGA CCTCGG CTCACAGCG
配列番号：355 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 3 （人工配列）	PD0968	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGACCG ACCTCG GCTCACAGCG
配列番号：356 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 4 （人工配列）	PD0969	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGACC GACCTC GGCTCACAGCG
配列番号：357 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 5 （人工配列）	PD0970	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGAC CGACCT CGGCTCACAGCG
配列番号：358 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 6 （人工配列）	PD0971	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTGA CCGACC TCGGCTCACAGCG
配列番号：359 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 7 （人工配列）	PD0972	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACTG ACCGAC CTCGGCTCACAGCG
配列番号：360 N末端 ACTB Tn5 読み出しF 8 （人工配列）	PD0973	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTACT GACCGA CCTCGGCTCACAGCG

配列番号：361 Cas14インデルについてのACTB N末端 NGS R （人工配列）	FP0952	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACCCAGCC AGCTCCC
配列番号：362 NGS EMX1 フォワード1 （人工配列）	PD0313	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCGGTGGCGCAT TGCCAC
配列番号：363 NGS EMX1 フォワード2 （人工配列）	PD0314	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACCGGTGGCGCA TTGCCAC
配列番号：364 NGS EMX1 フォワード3 （人工配列）	PD0315	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGACCGGTGGCGC ATTGCCAC
配列番号：365 NGS EMX1 フォワード4 （人工配列）	PD0316	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGACCGGTGGCG CATTGCCAC
配列番号：366 NGS EMX1 フォワード5 （人工配列）	PD0317	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGACCGGTGGC GCATTGCCAC
配列番号：367 NGS EMX1 フォワード6 （人工配列）	PD0318	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTGACCGGTGG CGCATTGCCAC

配列番号：368 NGS EMX1 フォワード7 （人工配列）	PD0319	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACTG ACCGGTG GCGCATTGCCAC
配列番号：369 NGS EMX1 フォワード8 （人工配列）	PD0320	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTACT GACCGGT GGCGCATTGCCAC
配列番号：370 NGS EMX1リバース （人工配列）	PD0321	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGA GTCCAGC TTGGGCCCA

【０１５８】

オフターゲット部位の配列は、以下の表９に見出され得る。

【０１５９】

【表９】

表9

配列番号/ 説明/ 起源	配列 (5’-3’)
配列番号：371 Cas9_chr6:149045959 （人工配列）	GATATTTTCCCAGCTCACCA
配列番号：372 Cas9_chr16:18607730 （人工配列）	TCTATTCTCCCAGCTCCCCA
配列番号：373 Bxb1_NC_000002 （人工配列）	AGCGGCTTCTGTCTCTGTGAGTGAGCTGGCGGTCTCCGTC

配列番号：374 Bxb1_NC_000003 （人工配列）	GACTAGCCCACGCTCCGGTTCTGAGCCGCGACGGCGGTCTCCG
配列番号：375 Bxb1_NC_000009 （人工配列）	CCCAGGGTCCCATGCGCTCCCCGGCCCTGACGGCGGTCTCC

【０１６０】
以下の表１０のリンカー配列。
【０１６１】
【表１０】

表10

説明	配列 (5'-3')	アミノ酸配列
A - P2A	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT GCTGAAGCAGGCTGGCGACGTGGAGG AGAACCCTGGACCT (配列番号: 410)	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (配列番号 : 418)
B - (GGGS)3	GGGGGAGGAGGTTCTGGAGGCGGAGG CTCCGGAGGCGGAGGGTCA (配列番号 : 411)	GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 : 419)
C - GGGGS	GGAGGTGGCGGGAGC (配列番号 : 412)	GGGGS (配列番号 : 420)
D - PAPAP	CCCGCACCAGCGCCT (配列番号 : 413)	PAPAP (配列番号 : 421)
E - (EAAAK)3	GAGGCAGCTGCCAAGGAAGCCGCT GCCAAGGAGGCGGCCGCAAAG (配列番号 : 414)	EAAAKEAAAKEAAAK (配列番号 : 422)
F - XTEN	AGTGGGAGCGAGACCCCTGGGACT AGCGAGTCAGCTACACCCGAAAGC (配列番号 : 415)	SGSETPGTSESATPES (配列番号 : 423)
G - (GGS)6	GGGGGGTCAGGTGGATCCGGCGG AAGTGGCGGATCCGGTGGATCTGG CGGCAGT (配列番号 : 416)	GGSGGSGGSGGSGGSGGS (配列番号 424)
H - EAAAK	GAAGCTGCTGCTAAG (配列番号 : 417)	EAAAK (配列番号 : 425)

【０１６２】
以下の表１１の例示的な融合配列。
【０１６３】

【表１１】

説明	配列
SpCas9-XTEN-RT(1-478)-Sto7d-GGGGS-BxbINT アミノ酸 配列番号 ：376	MKRTADGSEFESPKKKRKV**DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPS** **KKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRR** **KNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNI** **VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHF** **LIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSAR** **LSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDA** **KLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVN** **TEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQS** **KNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRK** **QRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILTFRIP** **YYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER** **MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAF** **LSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVED** **RFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIE**

	ERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGK TILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHI ANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTT QKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYL QNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDK NRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERG GLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIRE VKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALI KKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMN FFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSMP QVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDS PTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLE AKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELAL PSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISE FSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPA AFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDS GGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGSETPGTSESATPESSGSETPGTSESAT PESSGGSSGGSSTLNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAET GGMGLAVRQAPLIIPLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLD QGILVPCQSPWNTPLLPVKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTV PNPYNLLSGPPPSHQWYTVLDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDP EMGISGQLTWTRLPQGFKNSPTLFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQ YVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQTLGNLGYRASAKKAQICQKQV KYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPTPKTPRQLREFLGKAGFC RLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQKAYQEIKQALLTAPA LGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRRPVAYLSKKLDP VAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAPHAVEALVK QPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLLPLPEEG LQHNCLDGTGGGGVTVKFKYKGEELEVDISKIKKVWRVGKMISFT YDDNGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKSGKKSGGSKRTADGSEFE PKKKRKVGGGGSPKKKRKVYPYDVPDYAGSRALVVIRLSRVTDATTS PERQLESCQQLCAQRGWDVVGVAEDLDVSGAVDPFDRKRRPNLAR WLAFEEQPFDVIVAYRVDRLTRSIRHLQQLVHWAEDHKKLVVSAT EAHFDTTTPFAAVVIALMGTVAQMELEAIKERNRSAAHFNIRAGKY RGSLPPWGYLPTRVDGEWRLVPDPVQRERILEVYHRVVDNHEPLH LVAHDLNRRGVLSPKDYFAQLQGREPQGREWSATALKRSMISEAM LGYATLNGKTVRDDDGAPLVRAEPILTREQLEALRAELVKTSRAKP AVSTPSLLLRVLFCAVCGEPAYKFAGGGRKHPRYRCRSMGFPKHC GNGTVAMAEWDAFCEEQVLDLLGDAERLEKVWVAGSDSAVELAE VNAELVDLTSLIGSPAYRAGSPQREALDARIAALAARQEELEGLEAR PSGWEWRETGQRFGDWWREQDTAAKNTWLRSMNVRLTFDVRGG LTRTIDFGDLQEYEQHLRLGSVVERLHTGMS
SpCas9-XTEN-RT(1-478)-Sto7d-GGGGS-BxbINT 核酸 配列番号：377	ATGAAACGGACAGCCGACGGAAGCGAGTTCGAGTCACCAAAGAAG AAGCGGAAAGTCGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCA CCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCC CAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATC AAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAAACAG CCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCA GACGGAAGAACCGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGA GATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCC TTCCTGGTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCG GCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCACCAT

	CTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGAC CTGCGGCTGATCTATCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGG CCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTG GACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGA GGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG TCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCC AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCGGAAACCTGATTGC CCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGG CCGAGGATGCCAAACTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGA CCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTG TTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACAT CCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTCT ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGA AAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTT CTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGA GCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAAA AGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGG ACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCCA CCAGATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAA GATTTTTACCCATTCCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGA TCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGA AACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCA CCCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCCA GAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAAC GAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCG TGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAG AAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGGAC CTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAG AGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCC GGCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATC TGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAA CGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGG ACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCCACCTGTT CGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGG CTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAG CAGTCCGGCAAGACAATCCTGGATTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGC CAACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTT AAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCC TGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAA GGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTG ATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAG AGAACCAGACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAA TGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCT GAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCT GTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAG GAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACGCTATCG TGCCTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCT GACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTC CGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTG AACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTCGACAATCTGACCAAGG CCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAA GAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACA GATCCTGGACTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAG

10

20

30

40

50

	CTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCCTGAAGTCCAAGCTGGTGT CCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCAAC AACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAA CCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTA CGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGC GAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCA ACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCCAACGGCGA GATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGA GATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTG CTGAGCATGCCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGA CAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGA TAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGC GGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGGCCAA AGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCT GCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCC ATCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACC TGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGC CGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACG AACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGC CACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGCAGAAAC AGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGA GCAGATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAAT CTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCA TCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACCCTGACCAAT CTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACACCACCATCGACCG GAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATC CACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTC AGCTGGGAGGTGACTCTGGAGGATCTAGCGGAGGATCCTCTGGCAG CGAGACACCAGGAACAAGCGAGTCAGCAACACCAGAGAGCTCTGGT AGCGAGACACCCGGTACCAGTGAAAGCGCCACGCCAGAAAGCAGT GGGAGTGAGACTCCGGGTACATCTGAATCAGCGACACCGGAATCAA GTGGCGGCAGCAGCGGCGGCAGCAGCACCCTAAATATAGAAGATGA GTATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTCTAGGGT CCACATGGCTGTCTGATTTTCCTCAGGCCTGGGCGGAAACCGGGGGC ATGGGACTGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACCTCTGAAAGC AACCTCTACCCCCGTGTCCATAAAACAATACCCCATGTCACAAGAA GCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGACTGTTGGACCAGG GAATACTGGTACCCTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCCCTGCTACCC GTTAAGAAACCAGGGACTAATGATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGA GAGAAGTCAACAAGCGGGTGGAAGACATCCACCCCACCGTGCCCAA CCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCCCCCACCGTCCCACCAGTGGTACA CTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCTTTTTCTGCCTGAGACTCCACCCC ACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGG AATCTCAGGACAATTGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTTCAAA AACAGTCCCACCCTGTTTAATGAGGCACTGCACAGAGACCTAGCAG ACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTACGTGGAT GACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAAGGTAC TCGGGCCCTGTTACAAACCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCTCG GCCAAGAAAGCCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGT ATCTTCTAAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGACTGAGGCCAGAAAAGA GACTGTGATGGGGCAGCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACTAAGG GAGTTCCTAGGGAAGGCAGGCTTCTGTCGCCTCTTCATCCCTGGGTT TGCAGAAATGGCAGCCCCCCTGTACCCTCTCACCAAACCGGGGACT

	CTGTTTAATTGGGGCCCAGACCAACAAAAGGCCTATCAAGAAATCA AGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATTTGACT AAGCCCTTTGAACTCTTTGTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAAG GTGTCCTAACGCAAAAACTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTA CCTGTCCAAAAAGCTAGACCCAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGC CTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCGTACTGACAAAGGATGCAGGCA AGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCCATGCAGTA GAGGCACTAGTCAAACAACCCCCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCC GGATGACTCACTATCAGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAG TTCGGACCGGTGGTAGCCCTGAACCCGGCTACGCTGCTCCCACTGCC TGAGGAAGGGCTGCAACACAACTGCCTTGATGGGACAGGTGGCGGT GGTGTCACCGTCAAGTTCAAGTACAAGGGTGAGGAACTTGAAGTTG ATATTAGCAAAATCAAGAAGGTTTGGCGCGTTGGTAAAATGATATC TTTTACTTATGACGACAACGGCAAGACAGGTAGAGGGGCAGTGTCT GAGAAAGACGCCCCCAAGGAGCTGTTGCAAATGTTGGAAAAGTCTG GGAAAAAGTCTGGCGGCTCAAAAAGAACCGCCGACGGCAGCGAATT CGAGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCGGAGGTGGCGGGAGCCCAAA AAAGAAAAGAAAAGTGTATCCCTATGATGTCCCCGATTATGCCGGT TCAAGAGCCCTGGTCGTGATTAGACTGAGCCGAGTGACAGACGCCA CCACAAGTCCCGAGAGACAGCTGGAATCATGCCAGCAGCTCTGTGC TCAGCGGGGTTGGGATGTGGTCGGCGTGGCAGAGGATCTGGACGTG AGCGGGGCCGTCGATCCATTCGACAGAAAGAGGAGGCCCAACCTGG CAAGATGGCTCGCTTTCGAGGAACAGCCCTTTGATGTGATCGTCGCC TACAGAGTGGACCGGCTGACCCGCTCAATTCGACATCTCCAGCAGCT GGTGCATTGGGCTGAGGACCACAAGAAACTGGTGGTCAGCGCAACA GAAGCCCACTTCGATACTACCACACCTTTTGCCGCTGTGGTCATCGC ACTGATGGGCACTGTGGCCCAGATGGAGCTCGAAGCTATCAAGGAG CGAAACAGGAGCGCAGCCCATTTCAATATTAGGGCCGGTAAATACA GAGGCTCCCTGCCCCCTTGGGGATATCTCCCTACCAGGGTGGATGGG GAGTGGAGACTGGTGCCAGACCCCGTCCAGAGAGAGCGGATTCTGG AAGTGTACCACAGAGTGGTCGATAACCACGAACCACTCCATCTGGT GGCACACGACCTGAATAGACGCGGCGTGCTCTCTCCAAAGGATTAT TTTGCTCAGCTGCAGGGAAGAGAGCCACAGGGAAGAGAATGGAGTG CTACTGCACTGAAGAGATCTATGATCAGTGAGGCTATGCTGGGTTAC GCAACACTCAATGGCAAAACTGTCCGGGACGATGACGGAGCCCCTC TGGTGAGGGCTGAGCCTATTCTCACCAGAGAGCAGCTCGAAGCTCT GCGGGCAGAACTGGTCAAGACTAGTCGCGCCAAACCTGCCGTGAGC ACCCCAAGCCTGCTCCTGAGGGTGCTGTTCTGCGCCGTCTGTGGAGA GCCAGCATACAAGTTTGCCGGCGGAGGGCGCAAACATCCCCGCTAT CGATGCAGGAGCATGGGGTTCCCTAAGCACTGTGGAAACGGGACAG TGGCCATGGCTGAGTGGGACGCCTTTTGCGAGGAACAGGTGCTGGA TCTCCTGGGTGACGCTGAGCGGCTGGAAAAAGTGTGGGTGGCAGGA TCTGACTCCGCTGTGGAGCTGGCAGAAGTCAATGCCGAGCTCGTGG ATCTGACTTCCCTCATCGGATCTCCTGCATATAGAGCTGGGTCCCCA CAGAGAGAAGCTCTGGACGCACGAATTGCTGCACTCGCTGCTAGAC AGGAGGAACTGGAGGGCCTGGAGGCCAGGCCCTCTGGATGGGAGTG GCGAGAAACCGGACAGAGGTTTGGGGATTGGTGGAGGGAGCAGGA CACCGCAGCCAAGAACACATGGCTGAGATCCATGAATGTCCGGCTC ACATTCGACGTGCGCGGTGGCCTGACTCGAACCATCGATTTTGGCGA CCTGCAGGAGTATGAACAGCACCTGAGACTGGGGTCCGTGGTCGAA AGACTGCACACTGGGATGTCC

SpCas9 アミノ酸 配列番号 ：378	DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGA LLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFH RLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDK ADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKN LSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN REDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFLKDNREKIEKILT FRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSG EQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASL GTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAH LFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFA NRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIL QTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRL SDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKN YWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITK HVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKS EQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWD KGRDFATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKK DWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEII EQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGA PAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGD
RT(1-478)-Sto7d アミノ酸 配列番号 ：379	LNIEDEYRLHETSKEPDVSLGSTWLSDFPQAWAETGGMGLAVRQAPLII PLKATSTPVSIKQYPMSQEARLGIKPHIQRLLDQGILVPCQSPWNTPLLP VKKPGTNDYRPVQDLREVNKRVEDIHPTVPNPYNLLSGPPPSHQWYTV LDLKDAFFCLRLHPTSQPLFAFEWRDPEMGISGQLTWTRLPQGFKNSPT LFNEALHRDLADFRIQHPDLILLQYVDDLLLAATSELDCQQGTRALLQT LGNLGYRASAKKAQICQKQVKYLGYLLKEGQRWLTEARKETVMGQPT PKTPRQLREFLGKAGFCRLFIPGFAEMAAPLYPLTKPGTLFNWGPDQQK AYQEIKQALLTAPALGLPDLTKPFELFVDEKQGYAKGVLTQKLGPWRR PVAYLSKKLDPVAAGWPPCLRMVAAIAVLTKDAGKLTMGQPLVILAP HAVEALVKQPPDRWLSNARMTHYQALLLDTDRVQFGPVVALNPATLL PLPEEGLQHNCLDGTGGGGVTVKFKYKGEELEVDISKIKKVWRVGKMI SFTYDDNGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKSGKKSGGSKRTADGS
BxbINT アミノ酸 配列番号 ：380	SRALVVIRLSRVTDATTSPERQLESCQQLCAQRGWDVVGVAEDLDVSG AVDPFDRKRRPNLARWLAFEEQPFDVIVAYRVDRLTRSIRHLQQLVHW AEDHKKLVVSATEAHFDTTTPFAAVVIALMGTVAQMELEAIKERNRSA AHFNIRAGKYRGSLPPWGYLPTRVDGEWRLVPDPVQRERILEVYHRVV DNHEPLHLVAHDLNRRGVLSPKDYFAQLQGREPQGREWSATALKRSM ISEAMLGYATLNGKTVRDDDGAPLVRAEPILTREQLEALRAELVKTSRA KPAVSTPSLLLRVLFCAVCGEPAYKFAGGGRKHPRYRCRSMGFPKHCG NGTVAMAEWDAFCEEQVLDLLGDAERLEKVWVAGSDSAVELAEVNA ELVDLTSLIGSPAYRAGSPQREALDARIAALAARQEELEGLEARPSGWE WRETGQRFGDWWREQDTAAKNTWLRSMNVRLTFDVRGGLTRTIDFG DLQEYEQHLRLGSVVERLHTGMS

【実施例】

【０１６４】

いくつかの実験的な実施例が企図されるが、これらの実施例は非限定的であると意図される。

【０１６５】

［実施例１］

ＣＲＥ組込み効率

ＣＲＥ組込みの効率を試験した。ｌｏｘ７１／ｌｏｘ６６／Ｃｒｅリコンビナーゼ系を使用してＧＦＰを伴うＰＡＳＴＥの有効性を試験するために、レンチウイルスを使用して

ゲノム内に組み込まれたｌｏｘ７１配列（配列番号１）を有するクローンＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株を開発した。ＧＦＰの組込みは、（１）Ｃｒｅリコンビナーゼ発現プラスミドを含むプラス／マイナス配列番号７１、並びに（２）ＧＦＰ鋳型及び配列番号２のｌｏｘ６６　Ｃｒｅ部位を含む配列番号７２による修飾したＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株のトランスフェクションによって試験した。７２時間後、ｌｏｘ７１部位へのＧＦＰの組込み率をプローブした。図３は、様々なプラスミドの存在下でのＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株内のレンチウイルスを組み込んだｌｏｘ７１部位におけるＧＦＰの組込み率を示す。切断可能なリンカー又は切断可能でないリンカーを介してＰＥ２に連結したプライム編集複合体及びＣｒｅリコンビナーゼを有する哺乳動物発現ベクターである、ｐＣＭＶ　ＰＥ２　Ｐ２Ａ　Ｃｒｅ（配列番号７３）が、ＧＦＰの組込みを示すことが観察された。

【０１６６】

［実施例２］

Ｃｒｅリコンビナーゼを用いた部位特異的標的化エレメントによるプログラム可能な付加（ＰＡＳＴＥ）－Ｌｏｘ部位の付加

ｌｏｘ７１（配列番号１）又はｌｏｘ６６（配列番号２）配列を、プライム編集を使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞ゲノム内に挿入して、ＨＥＫ２９３ＦＴゲノム内へのＧＦＰの組込みを試験した。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞ゲノム内にｌｏｘ７１又はｌｏｘ６６配列を挿入するために、様々な長さのＲＴ領域に作動可能に連結された１３塩基対のＰＢＳ長を有するｐｅｇＲＮＡを使用した。以下のプラスミドをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞のトランスフェクションに使用した。細胞に、（１）プライム編集構築物（ＰＥ２）又は条件付きＣｒｅ発現を伴うＰＥ２、（２）ＨＥＫ３遺伝子座を標的とするＬｏｘ７１又はＬｏｘ６６　ｐｅｇＲＮＡ、及び（３）ＨＥＫ３遺伝子座を標的とするプラス／マイナス＋９０ＨＥＫ３ニッキング第２のガイドＲＮＡ（＋９０ｎｇＲＮＡ）をトランスフェクトした。７２時間後、ＨＥＫ３遺伝子座におけるＨＥＫ２９３ＦＴゲノムの編集率を、様々な長さのｌｏｘ７１又はｌｏｘ６６の組込みについてプローブした（図４を参照のこと）。＋９０ｎｇＲＮＡ（配列番号７５）を有する３４塩基対のｌｏｘ７１（ＨＥＫ３遺伝子座ガイド、配列番号８３；並びにＲＴ３４及びＰＢＳ１３を有するＬｏｘ７１　ｐｅｇＲＮＡ、配列番号８１）、及び＋９０ｎｇＲＮＡ（配列番号７５）を有する３４塩基対のｌｏｘ６６（ＨＥＫ３遺伝子座ガイド、配列番号８３；並びにＲＴ３４及びＰＢＳ１３を有するＬｏｘ６６　ｐｅｇＲＮＡ、配列番号８２）が、最も高い編集率を有することが観察された。

【０１６７】

［実施例３］

Ｃｒｅリコンビナーゼを用いたＰＡＳＴＥ－遺伝子の組込み

１３塩基対のＰＢＳ長及び３４塩基対の挿入長を有するｌｏｘ７１又はｌｏｘ６６　ｐｅｇＲＮＡを使用して、ＨＥＫ２９３Ｆゲノム内のＧＦＰの組込みをプローブした。ＰＥ及びＣｒｅは誘導性発現ベクターにおいて送達され、２日目に誘導された。ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞に以下のプラスミドをトランスフェクトした：（１）プライム編集構築物（ＰＥ２又は条件付きＣｒｅ発現を伴うＰＥ２）；（２）Ｌｏｘ７１　ｐｅｇＲＮＡ；（３）プラス／マイナス＋９０ＨＥＫ３ニッキングガイドＲＮＡ；及び（４）Ｌｏｘ６６部位を有するＥＧＦＰ鋳型。７２時間後、ｌｏｘ７１部位の編集率及びＧＦＰの組込み率を、様々なＰＥ／Ｃｒｅ構築物の存在下でｌｏｘ６６部位の有無にかかわらずプローブした。図５Ａは、異なるＰＥ／Ｃｒｅベクターによるｌｏｘ７１部位の編集率を要約する。図５Ｂは、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞ゲノム内のｌｏｘ７１部位におけるＧＦＰの組込み率を要約する。ｌｏｘ７１部位は、誘導性又は非誘導性ＰＥ／Ｃｒｅ発現系の存在下で編集されたが、ＧＦＰの組込みは存在しないことが観察された。

【０１６８】

［実施例４］

Ｂｘｂ１組込みデータレンチレポーター

組込み系を、より高い効率でゲノム内に標的遺伝子を組み込むことができるインテグラーゼ系に切り替えた。セリンインテグラーゼＢｘｂ１は、Ｃｒｅリコンビナーゼよりも活

性が高く、標的遺伝子の不可逆的な組込みについて細菌及び哺乳動物細胞において非常に効率的であることが示されている。図６は、Ｂｘｂ１を使用したＰＡＳＴＥ方法論の概略を示す（Ｍｅｒｒｉｃｋ，Ｃ．Ａ．ら、ＡＣＳ　Ｓｙｎｔｈ．Ｂｉｏｌ．２０１８、７、２９９～３１０頁）。

【０１６９】

Ｂｘｂ１組込み系の効率をプローブするために、レンチウイルスを使用して組み込んだａｔｔＢ　Ｂｘｂ１部位（配列番号３）を有するクローンＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株を開発した。次いで、修飾したＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株に以下のプラスミドを移入した：（１）プラス／マイナスＢｘｂ１発現プラスミド及び（２）ａｔｔＰ　Ｂｘｂ１部位を有するプラス／マイナスＧＦＰ（配列番号７６）又はＧ－Ｌｕｃ（配列番号７７）ミニサークル鋳型。７２時間後、ＨＥＫ２９３ＦＴゲノム内のａｔｔＢ部位へのＧＦＰ又はＧｌｕｃの組込みをプローブした。ａｔｔＢ遺伝子座へのＧＦＰ又はＧｌｕｃの組込み率を図７に示す。ＧＦＰ及びＧｌｕｃが、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞内のａｔｔＢ部位への効率的な組込みを示すことが観察された。

【０１７０】

［実施例５］

プライムを使用したヒトゲノムへのＢｘｂ１部位の付加

最高の効率でＨＥＫ２９３ＦＴ細胞株に組み込むことができるａｔｔＢの最大長をプローブした。プライム編集のためのａｔｔＢ（配列番号３）又はその逆相補体ａｔｔＰ（配列番号４）の最適な長さをプローブするために、様々なＲＴ相同長を有する１３ｎｔのＰＢＳ長を有するｐｅｇＲＮＡを使用した。以下のプラスミドをＨＥＫ２９３ＦＴにトランスフェクトした：（１）プライム発現プラスミド；（２）ＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡ設計；及び（３）ＨＥＫ３＋９０ニッキングガイド。７２時間後、ａｔｔＢ構築物の各々の組込み率をプローブした。図８は、各ＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡにおける編集率を示す。４４、３４及び２６塩基対を有するａｔｔＢ並びに３４及び２６塩基対を有するａｔｔＢ逆相補体が、最も高い編集率を示すことが観察された。

【０１７１】

次いで、組込みＰＡＳＴＥを、ＨＥＫ２９ＦＴ細胞内でＧＦＰを伴うタグ付けした細胞小器官マーカータンパク質を用いて試験した。ＰＡＳＴＥを使用して、異なる細胞培養ウェル中でＳＵＰＴ１６Ｈ、ＳＲＲＭ２、ＬＡＭＮＢ１、ＮＯＬＣ１及びＤＥＰＤＣ４をＧＦＰによりタグ付けし、顕微鏡を使用して細胞内のタンパク質局在化を追跡する際のＰＡＳＴＥの有用性を試験した。図９Ａ～９Ｇは、細胞小器官の各々についての蛍光顕微鏡検査の結果を示す。ＳＵＰＴ１６Ｈ－ＧＦＰは核内に豊富にあることが観察され、ＳＲＲＭ２－ＧＦＰは核スペックル内に豊富にあることが観察され、ＬＡＭＮＢ１－ＧＦＰは核膜内に豊富にあることが観察され、ＮＯＬＣ１－ＧＦＰは線維中心に豊富にあることが観察され、ＤＥＰＤＣ４－ＧＦＰはアグリソーム内に豊富にあることが観察された。

【０１７２】

プラスミドのトランスフェクションは、図１０Ａ～１０Ｂに示しているように、エレクトロポレーションを使用して達成することができる。

【０１７３】

［実施例６］

ＰＡＳＴＥによる遺伝子のプログラム可能な組込み

ＰＡＳＴＥによるＧｌｕｃ又はＥＧＦＰの遺伝子組込みの効率を試験した。ＰＡＳＴＥによる遺伝子組込みを可能にするために、以下のＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡを使用した：（１）４４ｐｅｇＲＮＡ：１３ｎｔのＰＢＳ及び４４ｎｔのＲＴ相同性；（２）３４ｐｅｇＲＮＡ：１３ｎｔのＰＢＳ及び３４ｎｔのＲＴ相同性；並びに（３）２６ｐｅｇＲＮＡ：１３ｎｔのＰＢＳ及び２６ｎｔのＲＴ相同性。

【０１７４】

ＨＥＫ２９３細胞株に以下のプラスミドＨＥＫ２９３ＦＴをトランスフェクトした：（１）プライム発現プラスミド；（２）Ｂｘｂ１発現プラスミド；（３）ＨＥＫ３標的化ｐ

ｅｇＲＮＡ設計；（４）ＨＥＫ３＋９０ニッキングガイド；及び（５）ＥＧＦＰ又はＧｌｕｃミニサークル。７２時間後、Ｇｌｕｃ又はＥＧＦＰの組込み率が観察された。図１１は、試験したＨＥＫ３標的化ｐｅｇＲＮＡの各々によるＥＧＦＰ及びＧｌｕｃの組込みを示す。ＰＡＳＴＥを使用すると、ＥＧＦＰ及びＧｌｕｃが効率的に組み込まれることが観察された。

【０１７５】

［実施例７］

複数の遺伝子を組み込むためのＰＡＳＴＥ

細胞内に複数の遺伝子を部位特異的に組み込むためのＰＡＳＴＥ技術は、直交するａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位を使用することで容易になる。中心ジヌクレオチドはＧＴからＧＡに変更でき、ａｔｔＢ／ａｔｔＰ部位を含有するＧＡのみが相互作用でき、ＧＴを含有する配列と交差反応しない。多重化ＰＡＳＴＥ編集のための直交するａｔｔＢ／ａｔｔＰ対を見出すためのジヌクレオチドの組合せのスクリーニングを実施することができる。Ｂｘｂ１レポーター系を使用して、多くの直交するジヌクレオチドの組合せを見出すことができることが示されている。

【０１７６】

これを試験するために、Ｂｘｂ１についてのａｔｔＢ^{GT}及びａｔｔＢ^{GA}ジヌクレオチドをプライム編集によってＡＣＴＢ部位に付加した。ＥＧＦＰ－ａｔｔＰ^{GT}ＤＮＡミニサークル及びｍＣｈｅｒｒｙ－ａｔｔＰ^{GA}ＤＮＡミニサークルを導入して、Ｂｘｂ１の存在下又は非存在下でのＥＧＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙ編集率を試験した。ＥＧＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙ編集の結果を図１４Ａ～１４Ｂに示す。

【０１７７】

適切なＧＴ－ＥＧＦＰ及びＧＡ－ｍＣｈｅｒｒｙ対による直交編集が達成され、細胞内での多重化ＰＡＳＴＥ編集の能力が実証された。

【０１７８】

２つの遺伝子を、多重化ＰＡＳＴＥを使用して同じ細胞内に導入して、単一反応において２つの異なる遺伝子をタグ付けした。ＥＧＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙを、単一反応においてｘ細胞株のＡＣＴＢ及びＮＯＬＣ１の遺伝子座内でタグ付けした。さらに、ＥＧＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙを、ＡＣＴＢ及びＬＡＭＮＢ１の遺伝子座内でタグ付けした。細胞は蛍光顕微鏡を使用して可視化した。図１５Ａ～１５Ｂは、多重化ＰＡＳＴＥについての蛍光顕微鏡検査の結果を示す。

【０１７９】

ａｔｔＢ及びａｔｔＰの９×９クロスにおいて、９つの異なるａｔｔＢ及びａｔｔＰ中心ジヌクレオチド－ＡＡ、ＧＡ、ＣＡ、ＡＧ、ＡＣ、ＣＣ、ＧＴ、ＣＴ及びＴＴ（配列番号７、８、２３、２４、１９、２０、２５、２６、２７、２８、９、１０、１５、１６、１７、１８、５及び６）による多重化の能力を試験した。編集は次世代シーケンシングを使用してプローブした。ａｔｔＢ及びａｔｔＰ中心ジヌクレオチドの９×９クロス－ＡＡ、ＧＡ、ＣＡ、ＡＧ、ＡＣ、ＣＣ、ＧＴ、ＣＴ及びＴＴ－の結果を図１６Ａに示す。ａｔｔＢ及びａｔｔＰの直交対のみが、最も高い編集率を示す。この結果は、図１６Ｂのヒートマップにも示されている。

【０１８０】

［実施例８］

アルブミン遺伝子座へのアルブミン及びＣＰＳ１の組込み

アルブミンガイドを有する１２個のｐｅｇＲＮＡを、ＰＢＳ及び可変長の逆転写酵素配列に連結させ、異なるニッキングガイドＲＮＡを使用してＨＥＫ２９３ＦＴ細胞をトランスフェクトした。アルブミンの編集率を、次世代シーケンシングを使用してプローブした。アルブミン遺伝子座におけるプライム編集の結果を図１７に示す。配列番号７９は、セルピナ１で最も高い編集率を示し、配列番号８０は、ＣＰＳ１で最も高い編集率を示したことが観察された。

【０１８１】

［実施例９］
Ｔ細胞の操作
ＣＤ８＋Ｔ細胞を操作するために、Ｔ細胞におけるＰＡＳＴＥ送達及び編集の効率を評価することができる（図１８）。ＡＣＴＢ標的化ｐｅｇＲＮＡを使用して、ＥＧＦＰ挿入鋳型を有する組込み部位を挿入できる。ＰＡＳＴＥ成分をＣＤ８＋Ｔ細胞に送達するために、未刺激のＴ細胞のために最適化されたエレクトロポレーションプロトコルと共にエレクトロポレーションを使用することができる。複数のプラスミドはエレクトロポレーションの効率を低下させる場合があるため、より少ないベクターを使用する統合されたＰＡＳＴＥ成分を適用することができる。
【０１８２】
５つのベクター、３つのベクター及び２つのベクターのＰＡＳＴＥ系は、３つのベクターのアプローチを使用した最大限の編集でロバストなＴ細胞編集を達成できることを示す（図１９）。さらに、プラスミド全体の量、細胞数及び電圧／アンペア数プロトコルを含む、エレクトロポレーション条件の拡張したセットを試験することができる。さらに、Ｔ細胞の刺激は、形質導入の効率及びＰＡＳＴＥ効率に影響を及ぼす場合がある。さらに、Ｔ活性化因子ＣＤ３／ＣＤ２８リガンドで刺激したＣＤ４＋／ＣＤ８＋Ｔ細胞混合物は、未刺激の細胞と比較してより高いＰＡＳＴＥ編集効率を有することができる。全体の送達率からＰＡＳＴＥの効率を分離するために、ＰＡＳＴＥベクター上のｍＣｈｅｒｒｙ発現カセットを評価して、トランスフェクトに成功したＴ細胞を選別することができる。最適化されたパラメーターが達成されると、ＴＲＡＣ、ＩＬ２Ｒα及びＰＤＣＤ１遺伝子座を含む、Ｔ細胞内のＰＡＳＴＥによる１０個の挿入部位のパネルを、単一及び多重化の両方の編集の文脈において異なる挿入物（例えば、ＥＧＦＰ、ＢＦＰ及びＹＦＰ）を使用して評価することができる。ＨＥＫ２９３ＦＴにおける関連部位の試験したサブセットは、ＥＧＦＰ挿入物に関して４０％を超える編集を達成した（図２０）。異なるＴＣＲ及びＣＡＲ構築物によるＴＲＡＣ遺伝子座でのＰＡＳＴＥ効率を評価することができる。Ｔ細胞は首尾よくトランスフェクトされて、ＣＡＲ又はＴＣＲの挿入を達成することができる。
【０１８３】
［実施例１０］
ＣＦＴＲのためのＰＡＳＴＥ
ＣＦＴＲ遺伝子座のためのＰＡＳＴＥを、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において試験して、ヒト細胞に対して最高の性能を発揮するｐｅｇＲＮＡ及びニッキング設計を特定することができる。また、Ｎｅｕｒｏ－２Ａ細胞を試験して、マウス細胞に対して最高の性能を発揮するｐｅｇＲＮＡ及びニッキング設計を特定することができる。最良の構築物を、マウス空気肺界面（ＡＬＩ）オルガノイドのインビトロでの試験、又はマウスにおける嚢胞性線維症の前臨床モデルでの送達に適用することができる。表１２は、ＣＦＴＲ遺伝子調節に関するｐｅｇＲＮＡ、ニッキングガイド及びミニサークルＤＮＡの特性を示す。
【０１８４】

【表１２】

表 12

可変物	特性
pegRNA	a. 17、13 及び 9nt 長の PBS、並びに b. 20、15 及び 10nt 長の RT を有する 38bpの短縮最小attB及び正常な46bpのattB配列
ニッキングガイド	ニッキングガイド 1 +64bp　ニッキングガイド 2 +23bp　ニッキングガイド 3 -60bp　ニッキングガイド 4 -78bp（距離は pegRNA の切断部位から計算する）
ミニサークル鋳型	A. CFTR コード配列のみ（約 4,454pb サイズ） B. CFTR コード配列+5' 及び 3' UTR（約 6,011bp サイズ） （両方のミニサークルは、Bxb1 及び bGH ポリ A シグナルによる組込みのためにそれらの上に attP 部位を有する）

【０１８５】

［実施例１１］

ＰＡＳＴＥを使用したＡｔｔＢ及びＥＧＰＦの組込み

ＡＣＴＢ遺伝子座におけるａｔｔＢ及びＥＧＰＦの組込みの効率を評価した（図２１Ａ～２１Ｃ）。Ｂｘｂ１がこの部位にＥＧＦＰ鋳型を付加できるかどうかを調べるために、以下の成分の各々を発現する５つのプラスミド系を使用した送達アプローチを展開した：１）ｐｅｇＲＮＡ発現、２）ニッキングガイド発現、３）プライム発現（Ｃａｓ９－ＲＴ）、４）Ｂｘｂ１発現、及び５）挿入鋳型（この場合、ＥＧＦＰ）。このアプローチは、シーケンシングによって測定した場合、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞において最大２４％のａｔｔＢ部位の編集効率及び約１０％のＥＧＦＰの組込みをもたらすことが判明した（図２１Ａ～２１Ｂ）。最適な活性は３～４日で達成され、全ての成分の単一ステップのトランスフェクション又はエレクトロポレーションとして実施することができる。ＥＧＦＰプラスミドはミニサークルとして設計されており、望ましくない細菌成分を全て除去できるため、Ｂｘｂ１組換え部位からの最小限の瘢痕と共に所望の遺伝子のみが挿入される。

【０１８６】

ツールをより簡単に使用するために、Ｂｘｂ１を、Ｃａｓ９－ＲＴ融合体に対するＰ２Ａリンカーを介してプライムに連結することができ、ＰＡＳＴＥタンパク質の発現のために２つではなく単一プラスミドのみを使用することができる。この最適化により、同じレベルの編集を維持することができ、ツールの使用及びその送達が容易になる（図２１Ｃ）。

【０１８７】

［実施例１２］

異なる細胞型におけるプログラム可能なＥＧＦＰ組込み

肝細胞癌細胞株ＨＥＰＧ２（図２２Ａ）及び慢性骨髄性白血病細胞株Ｋ５６２（図２２Ｂ）におけるプログラム可能なＥＧＦＰ組込みを評価した。Ｋ５６２及びＨＥＰＧ２細胞内のＡＣＴＢ遺伝子座において約１５％のＥＧＦＰ組込みが観察され、細胞型にわたるプラットフォームのロバスト性が実証された。

【０１８８】

［実施例１３］
ＰＡＳＴＥ活性を増強するためのＢｘｂ１の変異誘発
ＰＡＳＴＥ活性を増強するためのＢｘｂ１の変異誘発を評価した（図２３Ａ～２３Ｃ）。ＰＡＳＴＥ活性を最適化するための２つの手段が存在する：１）インテグラーゼの活性の改善、及び２）組込み配列のプライム付加の増強。図２３Ａ～２３Ｂに示しているように、ＰＡＳＴＥによって付加されるＢｘｂ１　ａｔｔＢ部位の約３０％のみがＢｘｂ１によって組み込まれるため、Ｂｘｂ１活性を改善することができる。これは、Ｂｘｂ１の効率を改善できれば、ＰＡＳＴＥも改善できることを示している。さらに、Ｂｘｂ１インテグラーゼにおける触媒残基を、保存及び構造分析によって特定し、ＰＡＳＴＥの一部として試験するためにＢｘｂ１変異体を生成した。図２３Ｂに示しているように、変異は組込みを約２０～３０％改善することができる。

【０１８９】
［実施例１４］
プライム編集組込み効率に対するｐｅｇＲＮＡ　ＰＢＳ及びＲＴの長さの効果
プライム編集組込み効率に対するｐｅｇＲＮＡ　ＰＢＳ及びＲＴの長さの効果を評価した（図２５Ａ～２５Ｆ）。ＰＡＳＴＥは、ＡＣＴＢ遺伝子座におけるＰＢＳ及びＲＴの長さを調整することによって最適化されて、最大約２０％の編集率を達成できることが判明した（図２５Ａ）。プライムはより短い配列の挿入に優れているため、ａｔｔＢ部位を短くするとＰＡＳＴＥ機能の改善に役立ち得ることが判明した。ＰＢＳ、ＲＴ及びａｔｔＢの長さのさらなる最適化により、ＬＭＮＢ１、ＮＯＬＣ１及びＧＲＳＦ１遺伝子座の上流での挿入について最適な設計が見出され得ることが示された（図２５Ｂ、２５Ｃ及び２５Ｄ）。ａｔｔＢについて３６ｎｔという短い長さでも、レポータープラスミドへの組込みには依然として機能的であることが判明した（図２５Ｂ及び２５Ｃ）。ａｔｔＢ配列の逆相補型は、プライム編集によって良好に組み込まれることが判明し、プライムを挿入している配列が重要であることが示唆された。ａｔｔＰ部位変異体によるＥＧＦＰ組込みは、特定の変異体が組込み効率を有意に改善できることを示した（図２５Ｅ）。また、ＰＡＳＴＥを、ＡＣＴＢ、ＬＭＮＢ１、ＳＵＰＴ１６Ｈ、ＳＲＲＭ２、ＮＯＬＣ１、ＫＬＨＬ１５、ＧＲＳＦ１、ＤＥＰＤＣ４、ＮＥＳ、ＰＧＭ１、ＣＬＴＡ、ＢＡＳＰ１及びＤＮＡＪＣ１８のＮ末端にＥＧＦＰを挿入する、遺伝子の大きなパネルを用いて実施した（図２５Ｆ）。デジタルドロップレットＰＣＲ（ｄｄＰＣＲ）を使用すると、編集率が約５％～４０％であることが判明した。

【０１９０】
［実施例１５］
ＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩのオンターゲット活性及びオフターゲット活性の比較
ＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩのオンターゲット活性及びオフターゲット活性を比較した（図２６Ａ～２６Ｆ）。ＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩは、同じガイド配列を使用した場合、それぞれ約２２％及び５％の組込み効率を有することが判明した（図２６Ａ及び２６Ｂ）。ＰＡＳＴＥは、１４個の遺伝子の編集を分析した場合、ほとんどの部位においてＨＩＴＩよりも性能が優れていることが判明した（図２６Ｃ）。ｄｄＰＣＲベースのアプローチを使用すると、ＰＡＳＴＥは、Ｂｘｂ１オフターゲット組込み（図２６Ｄ）及びＣａｓ９オフターゲット組込み（図２６Ｅ）に対して最小限のオフターゲット活性を有して非常に特異的であることが判明した。異なるサイズの挿入物の分析により、ＰＡＳＴＥが１ｋｂ～１０ｋｂのサイズの配列を確実に挿入できることが示され（図２６Ｆ）、ＰＡＳＴＥが作用可能な広範囲の配列サイズが明らかになった。より大きなサイズでの挿入効率の減少も観察され、これは、より大きなプラスミドサイズでのＨＥＫ２９３ＦＴ細胞へのプラスミド送達の低下による可能性が高かった。

【０１９１】
［実施例１６］
ＰＡＳＴＥ並びに直交するジヌクレオチドａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位による多重化
ＰＡＳＴＥ並びに直交するジヌクレオチドａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位による多重化を評

価した（図２８Ａ～２８Ｃ）。中心ジヌクレオチドモチーフの変異体について、複数の直交する組合せを見出した（図２８Ａ及び２８Ｂ）。図２８Ｃに示しているように、プログラム可能な多重化遺伝子挿入は、タンパク質成分を同一に保ちながら、異なるｐｅｇＲＮＡ及び遺伝子挿入物のみを送達するＰＡＳＴＥとのこれらの直交する組合せを使用することによって達成することができる（図８Ｃ）。

【０１９２】

［実施例１７］

内因性部位におけるＰＡＳＴＥ多重化組込み

内因性部位におけるＰＡＳＴＥ多重化組込みを評価した（図２８Ａ～２８Ｇ）。配列（ＧＬＳＧＱＰＰＲＳＰＳＳＧＳＳＧ（配列番号４２６））中のグリシン、セリン及びプロリンの富化のためにタンパク質リンカーに理想的なＢｘｂ１による組込み後に残されるａｔｔＲ瘢痕についてのリーディングフレームを特定した。ＰｅｇＲＮＡは、Ｎ末端における多数の遺伝子（ＡＣＴＢ、ＮＯＬＣ１、ＬＭＮＢ１、ＳＵＰＴ１６Ｈ、ＳＲＲＭ２及びＤＥＰＤＣ４）をＥＧＦＰによりタグ付けするためのａｔｔＲの解消のためにこのリンカーフレームを使用して設計した。これらの遺伝子の全ては、異なるタンパク質局在化の出現を有するため、適切な遺伝子タグ付けを確認するために顕微鏡を使用することができる。ＰＡＳＴＥは、参照画像及び細胞内のタンパク質の予想される局在化と一致するタンパク質局在化による高効率の遺伝子タグ付けが可能であることが判明した（図２８Ａ～２８Ｃ）。また、遺伝子を、多重化された様式においてタグ付けして、操作した組込み部位の直交性を実証した。ＡＣＴＢ、ＬＭＮＢ１、ＮＯＬＣ１及びＧＲＳＦを、一重、二重及び三重の群のＨＥＫ２９３ＦＴにおいて、それぞれＧＴ、ＴＧ、ＡＣ及びＣＡを担持する直交ｐｅｇＲＮＡにより標的化した（図２８Ｄ～２８Ｅ）。これらのジヌクレオチドを、ＥＧＦＰ、ＢＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙを担持する鋳型と対にして、これらの標識された遺伝子のマルチカラーイメージングを可能にした。これらの多重化実験についての組込みの効率は、約５％～３２％の範囲であることが判明し、ＰＡＳＴＥによる効率的な多重組込みが明らかになった。これらの多重化組込み実験の共焦点顕微鏡検査を使用して、これらの異なるタンパク質の同時標識化を伴う細胞が見出された（図２８Ｆ～２８Ｇ）。

【０１９３】

［実施例１８］

ＣＲＩＳＰＲベースのゲノム編集及び部位特異的組込みの組合せ

ＣＲＩＳＰＲベースのゲノム編集及び部位特異的組込みの組合せを評価した。

【０１９４】

異なるａｔｔＢの長さの切断を含むＰｅｇＲＮＡを評価した（図２９Ａ）。プライム編集は、ベーターアクチン（ＡＣＴＢ）遺伝子の遺伝子座に最大５６ｂｐの配列を挿入することができ、３１ｂｐ未満の長さでは効率がより高いことが判明した（図２９Ａ～Ｂ）。同族ランディング部位の組込みを複数の挿入酵素について試験した：Ｂｘｂ１、ＴＰ９０１及びｐｈｉＢＴ１ファージセリンインテグラーゼ並びにＣｒｅリコンビナーゼ。プライム編集は、１０～３０％の効率で、試験した全てのランディング部位を首尾よく挿入した（図２９Ｃ～Ｄ）。完全な系を試験するために、全ての成分を単一トランスフェクションにおいて組み合わせて送達した：プライム編集ベクター、ＰｅｇＲＮＡを含有するランディング部位、プライム編集を刺激するためのニッキングガイド、対応するインテグラーゼ又はリコンビナーゼのための哺乳動物発現ベクター、及び緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）をコードする９６９ｂｐのミニサークルＤＮＡカーゴ（図２９Ｅ）。４つのインテグラーゼ及びリコンビナーゼの間のＧＦＰ組込み率を比較すると、Ｂｘｂ１インテグラーゼが、標的化されたＡＣＴＢ遺伝子座において最も高い組込み率（約２０％）を有し、最適な性能のためにプライム編集ニッキングガイドを必要とすることが判明した（図２９Ｆ～Ｈ）。最後に、トランスフェクトする成分の数を減らすために、Ｂｘｂ１を、Ｐ２Ａタンパク質切断部位を介してＳｐＣａｓ９－Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素（ＰＥ２）融合タンパク質と共発現させた。この組合せは、最大３０％の高いＧＦＰ挿入効率を維持した（図２９Ｅ）。完全な系であるＰＡＳＴＥは、１０％を超える組込み効率で９，５００ｂｐもの大きさの

鋳型の正確な組込みを達成し（図２９Ｊ～Ｋ及び２６Ｅ）、完全長カーゴの完全な組込みをサンガーシーケンシングによって確認した（図３０Ａ～Ｅ）。

【０１９５】

［実施例１９］

プライム編集及びプライム編集に対するインテグラーゼパラメーターの影響

プライム編集及びプライム編集の組込み効率に対するインテグラーゼパラメーターの影響を評価した。

【０１９６】

ＰＡＳＴＥについての関連するｐｅｇＲＮＡパラメーターには、プライマー結合部位（ＰＢＳ）、逆転写鋳型（ＲＴ）及びａｔｔＢ部位の長さ、並びにｐｅｇＲＮＡスペーサー及びニッキングガイドの相対的な位置及び有効性が含まれる（図３１Ａ）。様々なＰＢＳ及びＲＴの長さを２つの遺伝子座であるＡＣＴＢ及びラミンＢ１（ＬＭＮＢ１）において試験すると、効率を支配する規則が遺伝子座間で異なり、より短いＰＢＳの長さ及びより長いＲＴの設計が、ＡＣＴＢ遺伝子座においてより高い編集を有し（図３１Ｂ）、より長いＰＢＳ及びより短いＲＴの設計が、ＬＭＮＢ１において良好に機能する（図３１Ｃ）ことが判明した。

【０１９７】

ａｔｔＢランディング部位の長さは、２つの相反する要素：より小さい挿入物のためのプライム編集のより高い効率、及びより短いａｔｔＢの長さにおけるＢｘｂ１組込みの効率の低下のバランスをとらなければならない。ＡｔｔＢの長さを、ＡＣＴＢ、ＬＭＮＢ１及び核小体リンタンパク質ｐ１３０（ＮＯＬＣ１）において評価すると、最適なａｔｔＢの長さは、遺伝子座に依存することが判明した。ＡＣＴＢ遺伝子座において、長いａｔｔＢの長さはプライム編集により挿入することができ（図２９Ｂ）、ＧＦＰを挿入するための全体的なＰＡＳＴＥ効率は、長いａｔｔＢの長さに対して最も高かった（図３１ｄ）。対照的に、中間のａｔｔＢの長さは、ＬＭＮＢ１（図３１Ｅ）及びＮＯＬＣ１（図３１Ｆ）においてより高い全体的な組込み効率（＞２０％）を有し、より短いａｔｔＢ配列を導入する効率の増加が、これらの部位でのＢｘｂ１組込みの低下を克服したことを示している。

【０１９８】

プライム編集のＰＥ３型は、挿入に対してフラップ中間体の解消を偏らせるためにＰＥ２及び追加のニッキングガイドを組み合わせる。ＰＡＳＴＥ編集に対するニッキングガイド選択の重要性を試験するために、ＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１遺伝子座における編集を２つのニッキングガイド位置により試験した。準最適なニッキングガイド位置は、ニッキングガイドの非存在下でのＰＡＳＴＥ効率の７５％低下（図２９Ｇ）と一致して、ＰＡＳＴＥ効率を最大３０％低下させることが判明した（図３２Ａ）。ｐｅｇＲＮＡスペーサー配列は、ＰＡＳＴＥ編集に必要であることが判明し、非標的化ガイドによるスペーサー配列の置換により編集が排除されることが判明した（図３２Ｂ）。

【０１９９】

ＰＡＳＴＥをさらに最適化するために、ＰＥ２構築物のＢｘｂ１インテグラーゼ及び逆転写酵素ドメインの両方に合理的な変異も導入した。これらの変異のいくつかは、ＰＡＳＴＥにより十分に許容されたが（図３３Ａ～Ｂ）、それらのいずれもＰＡＳＴＥ編集効率を改善しなかった。

【０２００】

短いＲＴ及びＰＢＳの長さは、編集にさらなる改善をもたらすことができる。より短いＲＴ及びＰＢＳガイドのパネルを、ＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１遺伝子座において試験し、より短いＲＴ及びＰＢＳ配列は、ＡＣＴＢにおいて編集を増加させなかったが（図３１Ｇ）、それらは、ＬＭＮＢ１における編集を改善し（図３１Ｈ）、最高の性能のガイドは、約４０％のＧＦＰ挿入率に達した（図３１Ｉ）ことが判明した。

【０２０１】

［実施例２０］

複数の内因性遺伝子におけるＰＡＳＴＥタグ付け

ＧＦＰ挿入効率を、ＰＡＳＴＥプログラミングの多用性を試験するために、７つの異なる遺伝子の遺伝子座であるＡＣＴＢ、ＳＵＰＴ１６Ｈ、ＳＲＲＭ２、ＮＯＬＣ１、ＤＥＰＤＣ４、ＮＥＳ及びＬＭＮＢ１において測定した。最大２２％の組込み率の範囲が見出された（図３４Ａ）。ＰＡＳＴＥはカーゴプラスミド上の相同性又は配列類似性を必要としないため、多様なカーゴ配列の組込みはモジュール式であり、異なる遺伝子座にわたって容易に拡大縮小される。９６９ｂｐ～４９０６ｂｐまでの様々なサイズである６つの異なる遺伝子カーゴを、ＰＡＳＴＥを用いてＡＣＴＢ及びＬＭＮＢ１遺伝子座における挿入について試験した。遺伝子及び挿入遺伝子座に応じて５％～２２％の組込み頻度が見出された（図３４Ｂ及び３５）。さらに、７つの一般的な治療遺伝子、ＣＥＰ２９０、ＯＴＣ、ＨＢＢ、ＰＡＨ、ＧＢＡ、ＢＴＫ及びＡＤＡのパネルを、ＡＣＴＢ遺伝子座における挿入について評価し、これらのカーゴの効率的な組込みが、５％～２０％であることが判明した（図３４Ｃ）。

【０２０２】

内因性遺伝子発現を崩壊させることなく、インフレームタンパク質タグ付け又はカーゴの発現についてのＰＡＳＴＥの正確な挿入を評価した。Ｂｘｂ１は、カーゴ組込み後にゲノム内に残存配列（ａｔｔＬ及びａｔｔＲと呼ばれる）を残すため、これらのゲノム瘢痕はタンパク質リンカーとして機能することができる。ａｔｔＲ配列のフレームは、ミニサークルカーゴ上にａｔｔＰの戦略的な配置によって配置され、適切なタンパク質リンカーであるＧＧＬＳＧＱＰＰＲＳＰＳＳＧＳＳＧ（配列番号４２７）を実現した。このリンカーを使用して、４つの遺伝子（ＡＣＴＢ、ＳＲＲＭ２、ＮＯＬＣ１及びＬＭＮＢ１）を、ＰＡＳＴＥを使用してＧＦＰによりタグ付けした。正確な遺伝子タグ付けを評価するために、ＧＦＰの細胞内位置を免疫蛍光法によりタグ付けした遺伝子産物と比較した。４つ全ての標的とされた遺伝子座について、ＧＦＰはタグ付けした遺伝子産物と共局在化し、タグ付けが成功したことを示した（図３４Ｄ～Ｅ）。

【０２０３】

［実施例２１］

Ｂｘｂ１組込みのための直交配列選好

Ｂｘｂ１の中心ジヌクレオチドは、組込みのためのａｔｔＢ及びａｔｔＰ部位の会合に関与しており、一致する中心ジヌクレオチド配列を変更すると、インテグラーゼ活性が修飾され、２つの遺伝子の挿入に直交性がもたらされ得る。ａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチドのセットを拡張すると、ＰＡＳＴＥによる多重化遺伝子挿入が可能になり得る。１６個全てのジヌクレオチドａｔｔＢ／ａｔｔＰ配列対にわたるＰＡＳＴＥによるＡＣＴＢ遺伝子座におけるＧＦＰ組込みの効率を、ＰＡＳＴＥ挿入に最適なａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチドを見出すためにプロファイリングした。野生型ＧＴ配列よりも高い組込み効率を有するいくつかのジヌクレオチドが見出された（図３６Ａ）。ジヌクレオチドの大部分は、野生型ａｔｔＢ／ａｔｔＰ効率と比較して７５％以上の編集効率を有しており、これらのジヌクレオチドがＰＡＳＴＥによる多重化遺伝子挿入のための直交チャネルとなり得ることを示唆している。

【０２０４】

次に、一致した及び一致していないａｔｔＢ／ａｔｔＰジヌクレオチド相互作用の特異性を評価した。ａｔｔＢ／ａｔｔＰ組込みを比較するためにプールしたアッセイを使用したスケーラブルな様式において全てのジヌクレオチドの組合せ間の相互作用をプロファイリングした（図３６Ｂ）。１６個のａｔｔＰジヌクレオチドプラスミドを固有の識別子によりバーコード化し、このａｔｔＰプールにＢｘｂ１インテグラーゼ発現ベクター及び単一のａｔｔＢジヌクレオチドアクセプタープラスミドを共トランスフェクトし、得られた組込み産物をシーケンシングすることによって、可能な全てのａｔｔＢ／ａｔｔＰ対の相対的な組込み効率を測定した（図３６Ｃ）。ジヌクレオチド特異性は多様であることが判明し、一部のジヌクレオチド（ＧＧ）は無視できるほどのクロストークで強い自己相互作用を示し、他のジヌクレオチド（ＡＡ）は最小限の自己選好を示した。ａｔｔＰ選好の配

列ロゴ（図３７）により、最初の位置にＣ又はＧを有するジヌクレオチドが、共有した最初の塩基を有するａｔｔＢジヌクレオチド配列に対してより強い選好を有するが、他のａｔｔＰジヌクレオチド、特に最初の位置にＡを有するジヌクレオチドは、最初のａｔｔＢ塩基に対する特異性が低いことが明らかになった。

【０２０５】

次に、ＧＡ、ＡＧ、ＡＣ及びＣＴジヌクレオチドｐｅｇＲＮＡを、対応するａｔｔＰカーゴと対になった又は他の３つのジヌクレオチドａｔｔＰ配列と誤って対になった、ＡＣＴＢにおけるＧＦＰ組込みについて試験した。試験したジヌクレオチドの４つ全てが、対応するａｔｔＢ／ａｔｔＰ対と対になった場合にのみカーゴを効率的に組込み、誤って対になった組合せにわたって検出可能な組込みはなかったことが判明した（図３６Ｄ）。

【０２０６】

［実施例２２］

ＰＡＳＴＥを用いた多重遺伝子組込み

一致したａｔｔＰカーゴをゲノム内の特定の部位に方向付ける直交ｐｅｇＲＮＡを使用することによる細胞内での多重化を評価した（図３８Ａ）。上位３つのジヌクレオチド結合部位対（ＣＴ、ＡＧ及びＧＡ）を選択して、ＡＣＴＢ（ＣＴ）、ＬＭＮＢ１（ＡＧ）及びＮＯＬＣ１（ＧＡ）を標的とするｐｅｇＲＮＡ、並びにＧＦＰ（ＣＴ）、ｍＣｈｅｒｒｙ（ＡＧ）及びＹＦＰ（ＧＡ）を含有する対応するミニサークルカーゴを設計した。これらの試薬を細胞に同時送達すると、５％～２５％の範囲の組込みにおいてこれらのｐｅｇＲＮＡ及びカーゴの全ての可能な組合せの一重、二重及び三重編集が達成されることが判明した（図３８Ｂ）。

【０２０７】

多重化遺伝子組込みの用途は、細胞内局在化及び同じ細胞内の相互作用を可視化するために異なるタンパク質を標識するためである。ＰＡＳＴＥを、同じ細胞内でＡＣＴＢ（ＧＦＰ）及びＮＯＬＣ１（ｍＣｈｅｒｒｙ）又はＡＣＴＢ（ＧＦＰ）及びＬＭＮＢ１（ｍＣｈｅｒｒｙ）を同時にタグ付けするために使用した。ＧＦＰ及びｍＣｈｅｒｒｙ蛍光の重複は観察されず、タグ付けした遺伝子が、ＡＣＴＢ、ＮＯＬＣ１及びＬＭＮＢ１タンパク質産物の既知の細胞内局在化に基づいて、それらの適切な細胞内コンパートメントにおいて可視化できることが確認された（図１５Ａ～Ｂ）。

【０２０８】

［実施例２３］

ＤＳＢベースの挿入方法と比較したＰＡＳＴＥ効率

ＰＡＳＴＥ効率は、同等のＤＳＢベースの挿入方法を上回ることが判明した。

【０２０９】

ＰＡＳＴＥ編集を、ＮＨＥＪ（すなわち、相同非依存的標的化組込み、ＨＩＴＩ）又はＨＤＲ経路のいずれかを使用してＤＳＢ依存的遺伝子組込みと並行して評価した。ＰＡＳＴＥは、ＨＩＴＩ（図３９Ａ～Ｂ）又はＨＤＲ（図３９Ｃ～Ｄ）のいずれかと同等又はそれより良好な遺伝子挿入効率を有した。７つの異なる内因性標的のパネルにおいて、ＰＡＳＴＥは、７つの遺伝子のうちの６つにおいてＨＩＴＩ編集を上回り、７番目の遺伝子については同様の効率を有した（図３９Ａ）。ＤＳＢ生成は、代替の望ましくない編集結果として挿入又は欠失（インデル）を引き起こす可能性があるため、３つ全ての方法のインデル頻度を次世代シーケンシングによって評価すると、ＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨｅｐＧ２細胞の両方におけるＨＤＲ又はＨＩＴＩのいずれかよりもＰＡＳＴＥにより生成されたインデルが大幅に少ないことが判明し（図３９Ｂ、３９Ｄ及び４０Ａ）、ＰＡＳＴＥによる高純度の遺伝子組込み結果を示している。

【０２１０】

［実施例２４］

ＰＡＳＴＥ及びＨＩＴＩ遺伝子組込みのオフターゲット特性評価

オフターゲット編集をゲノム編集技術において使用することができる。特定の部位におけるＰＡＳＴＥの特異性を、ヒトゲノムにおける偽ａｔｔＢ部位へのＢｘｂ１の組込みに

よって生成されたオフターゲット、並びにヒトゲノムにおけるガイド及びＣａｓ９依存的編集によって生成されたオフターゲットに基づいて評価した（図３９Ｅ）。Ｂｘｂ１は偽結合部位におけるヒトゲノムへの立証された組込みを欠くが、天然のＢｘｂ１　ａｔｔＢコア配列に対して部分的な類似性を有する潜在的な部位が、コンピューターによって特定された。これらの部位にわたるｄｄＰＣＲによるＢｘｂ１組込みを試験すると、オフターゲット活性は見出されなかった（図３９Ｆ及び４０Ｂ～Ｄ）。ＡＣＴＢ　ｐｅｇＲＮＡについてのＣａｓ９オフターゲットをアッセイするために、コンピューター予測によって２つの潜在的なオフターゲット部位を特定し、ＰＡＳＴＥについてのオフターゲット組込みは見出されなかったが（図３９Ｇ及び４０Ａ～Ｄ）、部位の１つにおいてＨＩＴＩによる実質的なオフターゲット活性が見出された（図３９Ｈ及び４０Ａ～Ｄ）。

【０２１１】

挿入ゲノム接合部のタグ付け及びＰＣＲ増幅を通じて、Ｃａｓ９又はＢｘｂ１のいずれかによるゲノムワイドオフターゲットをさらに評価した（図３９Ｉ）。単一細胞クローンを、ＰＡＳＴＥ編集及びＰＥ２を欠く陰性対照を含む条件について単離し、これらのクローンからの挿入ゲノム接合部のディープシーケンシングにより、全ての読み取りがオンターゲットＡＣＴＢ部位に整列していることが示され、オフターゲットゲノム挿入がないことが確認された（図３９Ｊ～Ｌ）。

【０２１２】

ＰＡＳＴＥに関与する逆転写酵素及びインテグラーゼの発現は、細胞の健康に悪影響を与える可能性がある。完全なＰＡＳＴＥ系、ＰＥ２のみを有する対応するガイド及びカーゴ、並びにＢｘｂ１のみを有する対応するガイド及びカーゴをトランスフェクトし、トランスクリプトームワイドＲＮＡシーケンシングによりタンパク質発現を伴わないＧＦＰ対照トランスフェクション及びガイドの両方を比較して、これらの効果の程度を決定した。プライム編集の非存在下でのＢｘｂ１発現は、いくつかの有意なオフターゲットを有することが判明したが、完全なＰＡＳＴＥ系は、１．５倍を超える変化を伴う１つのみの差次的に調節された遺伝子を有した（図４１Ａ～Ｂ）。Ｂｘｂ１過剰発現によって上方制御された遺伝子は、ＴＥＮＴ５Ｃ及びＤＤＩＴ３などのストレス応答遺伝子を含んだが、これらの変化はＰＡＳＴＥ系の発現では見られず（図４１Ｃ）、ＰＡＳＴＥ構築物上のＰ２Ａリンカーからのの発現の減少による可能性がある。

【０２１３】

［実施例２５］

非分裂細胞におけるＰＡＳＴＥ効率

非分裂細胞におけるＰＡＳＴＥ活性を評価した。Ｃａｓ９及びＨＤＲ鋳型又はＰＡＳＴＥをＨＥＫ２９３ＦＴ細胞にトランスフェクトし、細胞分裂をアフィディコリン処理によって停止させた（図４２Ａ）。遮断した細胞分裂のこのモデルにおいて、ＰＡＳＴＥは、ＡＣＴＢ遺伝子座における２０％を超えるＧＦＰ遺伝子組込み活性を維持することが見出されたが、ＨＤＲ媒介組込みは消失した（図４２Ｂ及び４３Ａ）。

【０２１４】

［実施例２６］

治療用導入遺伝子の産生及び分泌

より大きな導入遺伝子を用いて、及び追加の細胞株においてＰＡＳＴＥを評価した。

【０２１５】

治療用導入遺伝子についてのサイズ制限を評価するために、分裂細胞及びアフィディコリン処理細胞の両方において長さが最大１３．３ｋｂのカーゴの挿入を評価した。１０％を超える挿入効率が判明し（図４２Ｃ）、全ての完全長ヒトｃＤＮＡ導入遺伝子の約９９．７％の挿入が可能となった。送達の非効率による細胞への大きな挿入物送達の低下を克服するために、より多くのＤＮＡ量の挿入物を送達することにより、遺伝子組込み効率が著しく改善されることが判明した（図４３Ｂ）。Ｋ５６２リンパ芽球株及び初代ヒトＴ細胞におけるＰＡＳＴＥなどの追加の細胞型に対するＰＡＳＴＥ編集も評価した。ＰＥ２－Ｐ２Ａ－Ｂｘｂ１（ＰＡＳＴＥ）並びにＰＥ２及びＢｘｂ１の別々の送達の両方が、両方

の細胞型において効率的な編集をもたらすことが判明した（図４２Ｄ～Ｅ）。最後に、インビボでのＰＡＳＴＥの治療的送達は、ＤＮＡカーゴのウイルス送達を必要とする可能性があるため、ＡＡＶが、Ｂｘｂ１を介してゲノム内に組み込むことができるａｔｔＰを含有するペイロードを送達できるかどうかを評価した。ＡＣＴＢ遺伝子座を標的とすると、ＡＡＶは、インテグラーゼ媒介挿入に適した鋳型を、用量依存的に最大４％の割合で送達可能であることが判明した（図４２Ｆ及び４３Ｃ）。

【０２１６】

ＰＡＳＴＥの効率を改善するために、プライム編集のためにＰＥ２＊ＮＬＳを組入れると、複数の遺伝子座におけるＰＡＳＴＥ組込みを改善することが判明した（図４４Ａ）。さらに、ＰＥ２＊は、より低い滴定のカーゴプラスミドにおいてよりロバストな組込みをもたらし、８ｎｇのプラスミドという低い量での組込みを実証した（図４４Ｂ）。不完全なプラスミド送達によるＰＡＳＴＥ効率の低下に対抗するために、ピューロマイシン耐性遺伝子を同時送達し、薬物選択の存在下でＰＡＳＴＥ効率を増加させることが判明した（図４５）。

【０２１７】

プログラム可能な遺伝子組込みにより、治療用タンパク質産物の発現のためのモダリティが提供され、疾患アルファ－１アンチトリプシン欠損症及びＣＰＳ１欠損症にそれぞれ関与する、治療的に関連するタンパク質であるアルファ－１アンチトリプシン（セルピナ１によってコードされる）及びカルバモイルリン酸シンテターゼＩ（ＣＰＳ１によってコードされる）についてタンパク質産生を評価した。遺伝子産物を発光タンパク質サブユニットＨｉＢｉＴによりタグ付けすることによって、導入遺伝子の産生及び分泌を、ＰＡＳＴＥ処理に応じて独立して評価した（図４２Ｇ）。ＰＡＳＴＥに、ＨＥＫ２９３ＦＴ細胞及びヒト肝細胞癌細胞株（ＨｅｐＧ２）においてセルピナ１又はＣＰＳ１カーゴをトランスフェクトし、ＡＣＴＢ遺伝子座における効率的な組込みを見出した（図４２Ｈ～Ｉ）。この組込みにより、ロバストなタンパク質発現、導入遺伝子産物の細胞内蓄積（図４２Ｊ及び４６Ａ～Ｂ）、及び培地へのタンパク質の分泌（図４２Ｋ）がもたらされた。

【０２１８】

［実施例２７］

最適化したＰＡＳＴＥ構築物

複合体の活性を最適化するために、代替の逆転写酵素融合及び変異、逆転写酵素ドメインとインテグラーゼとの間及びＣａｓ９と逆転写酵素ドメインとの間の様々なリンカー、並びに逆転写酵素及びＢｘｂＩＮＴドメイン変異体を含む、タンパク質修飾のパネルをスクリーニングした（図４７Ａ及び図４９Ｃ～図４９Ｆ）。Ｃａｓ９と逆転写酵素との間の４８残基のＸＴＥＮリンカー、及びＳｔｏ７ｄ　ＤＮＡ結合ドメインへのＭＭｕＬＶの融合（Ｏｓｃｏｒｂｉｎら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．５９４．４３３８～４３５６頁．２０２０）を含む、多くのタンパク質修飾により、編集効率が改善した（図４７Ａ及び図４９Ｃ～図４９Ｄ）。これらの上位の修飾を、逆転写酵素－Ｓｔｏ７ｄドメインと ＢｘｂＩＮＴとの間のＧＧＧＧＳリンカー（配列番号４２０）と組み合わせると、それらは、約５５％の遺伝子組込みをもたらし、インテグラーゼを標的部位に直接動員する重要性が強調された（図４７Ａ）。この最適化した構築物は、ＳｐＣａｓ９－（ＸＴＥＮ－４８）－ＲＴ－Ｓｔｏ７ｄ－（ＧＧＧＧＳ）－ＢｘｂＩＮＴと呼ばれた。最適化した構築物は、約２０％の組込み効率で約３６，０００ｂｐもの大きさの鋳型の正確な組込を達成し（図４７Ａ）、サンガーシーケンシングによって確認された完全長カーゴの完全な組込みを伴った。

【０２１９】

さらに、異なるＡｔｔＢの長さの切断を含むｐｅｇＲＮＡを試験すると、プライム編集が、ベーターアクチン（ＡＣＴＢ）遺伝子の遺伝子座において最大５６ｂｐの配列を挿入でき、３１ｂｐ未満の長さにおいてより高い効率であったことが判明した（図４８Ａ～図４８Ｂ）。Ｂｘｂ１（すなわち、ＢｘｂＩＮＴ）、ＴＰ９０１（すなわち、Ｔｐ９ＩＮＴ）及びｐｈｉＢＴ１（すなわち、Ｂｔ１ＩＮＴ）ファージセリンインテグラーゼを含む、複数の酵素のパネルを評価した。プライム編集は、１０～３０％の効率で、試験した全て

のランディング部位の挿入に成功した（図４８Ｃ～図４８Ｄ）。

【０２２０】

［実施例２８］

ウイルス送達及びインビボ編集

完全なＰＡＳＴＥ系をウイルスベクターにパッケージングするために、ＡｄＶベクターを利用した（図５０Ｂ）。アデノウイルスを、ＳｐＣａｓ９－ＲＴ－ＢｘｂＩＮＴ及びガイド発現のためのプラスミドと共に、ＢｘｂＩＮＴ媒介挿入に適した鋳型を送達できるかどうか、又はＳｐＣａｓ９－ＲＴのプラスミド送達を伴うガイド及びＢｘｂＩＮＴのＡｄＶ送達ができるかどうかについて評価し、ＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨｅｐＧ２細胞内でＥＧＦＰを担持する約３６ｋｂのアデノウイルスゲノムの１０～２０％の組込みが達成されたことが判明した（図５０Ｃ）。３つのＡｄＶベクターにわたってカーゴ及びＰＡＳＴＥ系の成分をパッケージングし、送達すると、完全なＰＡＳＴＥ系（Ｃａｓ９逆転写酵素、インテグラーゼ及びガイドＲＮＡ又はカーゴ）をアデノウイルス送達によって置換することができ、ＨＥＫ２９３ＦＴ及びＨｅｐＧ２細胞においてウイルスのみの送達で最大約５０～６０％の組込みであった（図５０Ｄ）。

【０２２１】

ＰＡＳＴＥが、インビボ送達に適していることをさらに実証するために、ＰＡＳＴＥタンパク質成分のｍＲＮＡ型、並びに化学的に修飾された合成ａｔｇＲＮＡ及びＬＭＮＢ１標的に対するニッキングガイドを開発した（図５０Ｅ）。アデノウイルス又はプラスミドを介した鋳型の送達と共にｍＲＮＡ及びガイドのエレクトロポレーションにより、最大約２３％の高い効率の組込みが得られた（図５０Ｅ～図５０Ｆ）。より持続的なＢｘｂＩＮＴ発現により、ゲノム内に新たに配置されたＡｔｔＢ部位への組込みが可能になり得るため、環状ｍＲＮＡ発現を試験すると、組込みの効率が約３０％まで上昇することが判明した（図５０Ｇ～図５０Ｉ）。

【０２２２】

［実施例２９］

ＰＡＳＴＥによる同時に行われる欠失及び挿入

ＰＡＳＴＥ系を使用して、１つの配列の欠失及び別の配列の挿入を同時に行った。ＡｔｔＢ核酸配列の組み合わせた挿入と共にＬＭＮＢ１の最初のエクソンの１３０ｂｐ及び３８５ｂｐの欠失を実施した（図５１Ａ）。このデータは、ＰＡＳＴＥ系を使用してＤＮＡ配列を置き換えることが可能であることを示している。

【０２２３】

ＰＡＳＴＥ系を使用して、９６７ｂｐのカーゴの組み合わせた挿入と共にＬＭＮＢ１の最初のエクソンの１３０ｂｐの欠失も実施した。

【０２２４】

２つのａｔｔＰ配列のうちの１つは、上記のように、変異したＡｔｔＰを有するミニサークル鋳型を使用して挿入した。このＡｔｔＰ変異体は、特により短いＡｔｔＢ（３８～４４ｂｐ）について、より優れた組込み動態及び効率を示す。この実験において使用したＬＭＮＢ１　ＡｔｔＢは３８ｂｐである（図５１Ｂ）。

【図面】

【図１】

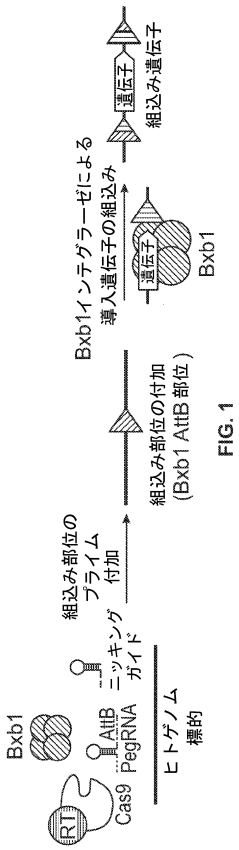


FIG. 1

【図２】

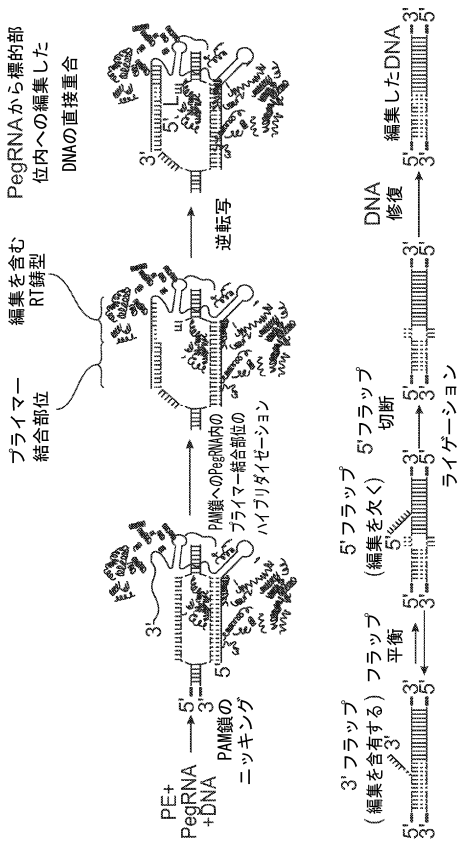


FIG. 2

【図３】

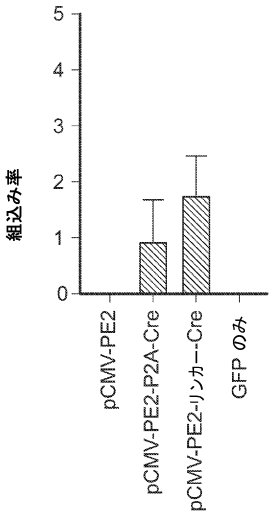


FIG. 3

【図４】

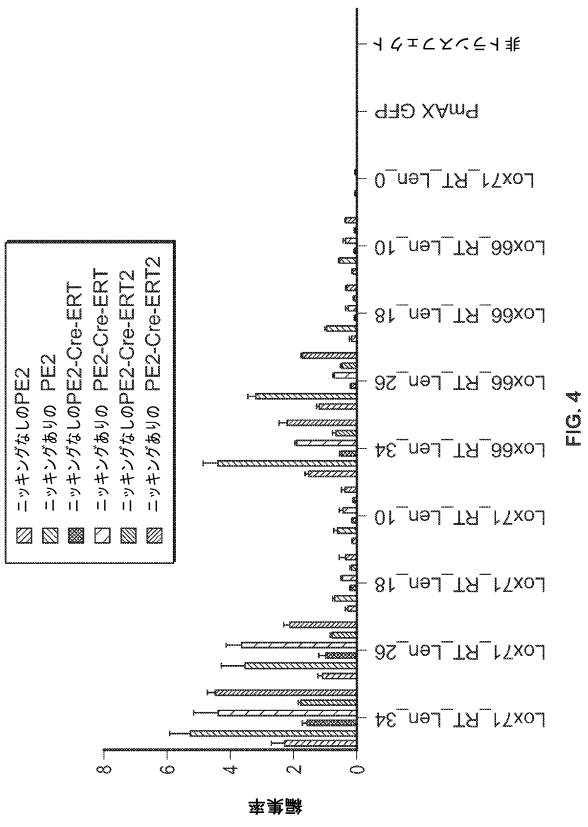


FIG. 4

【図５Ａ】

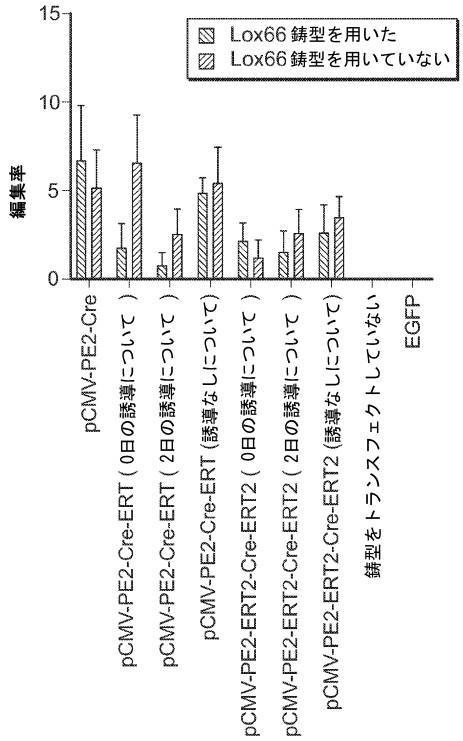


FIG. 5A

【図５Ｂ】

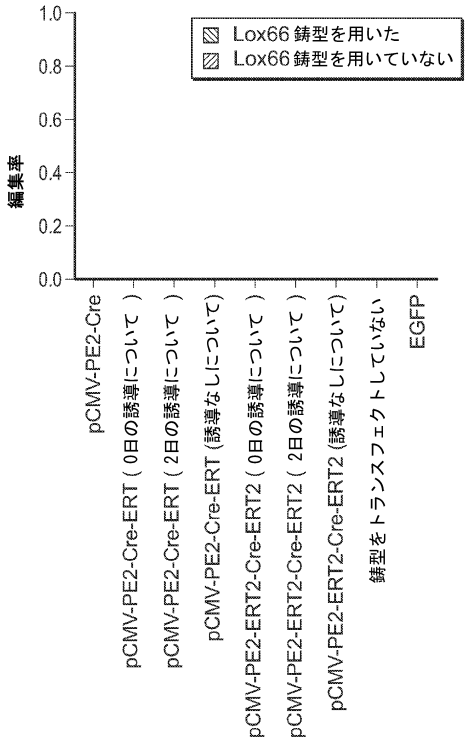


FIG. 5B

【図６】

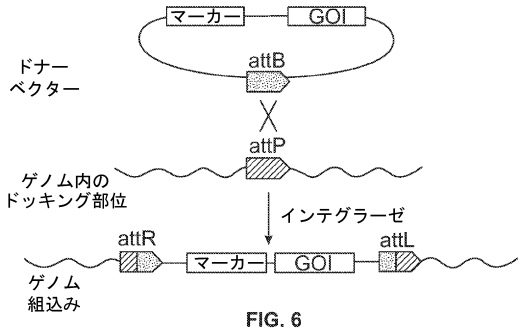


FIG. 6

【図７】

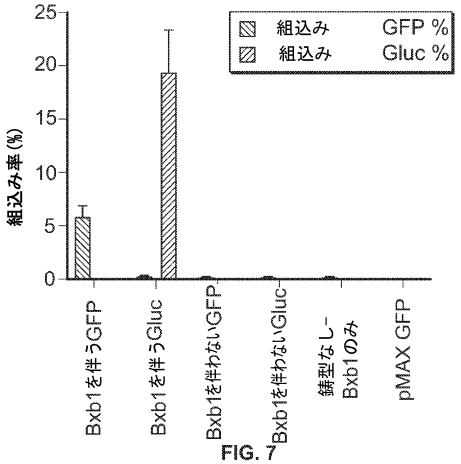


FIG. 7

【図８】

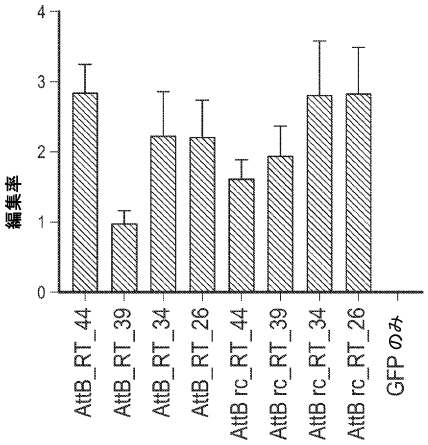


FIG. 8

【図９Ａ】

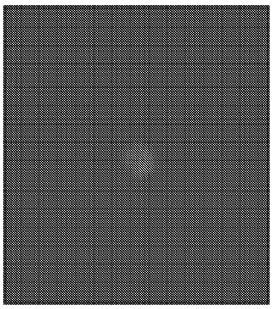


FIG. 9A

【図９Ｂ】

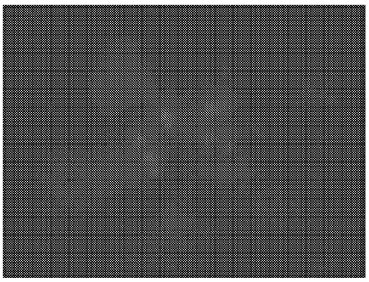


FIG. 9B

【図９Ｃ】

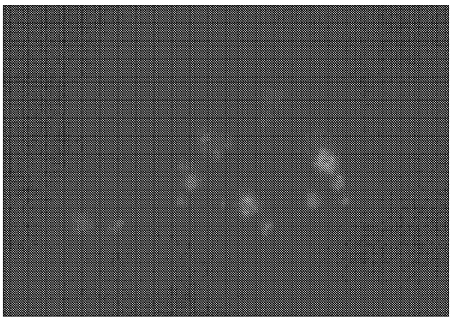


FIG. 9C

【図９Ｄ】

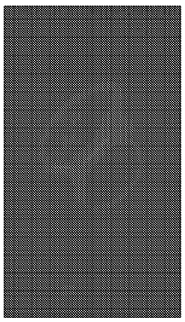


FIG. 9D

【図９Ｅ】

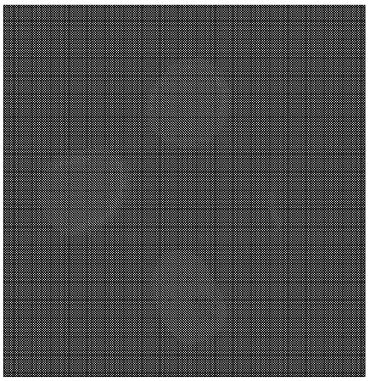


FIG. 9E

【図９Ｆ】

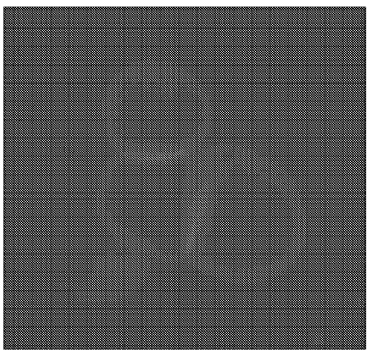


FIG. 9F

【図９Ｇ】

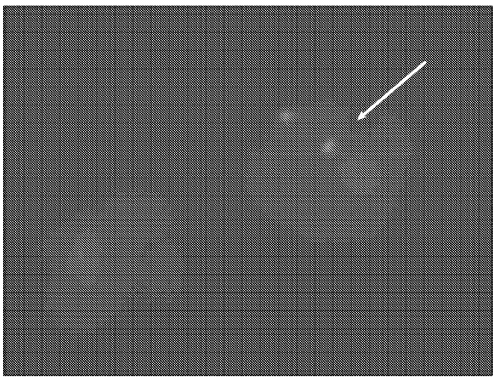


FIG. 9G

【図１０Ａ】

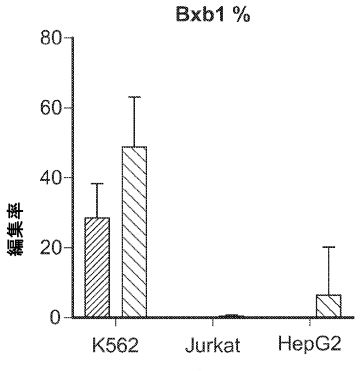


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

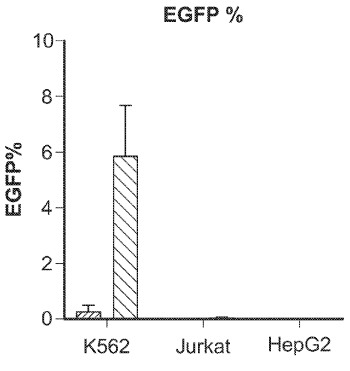


FIG. 10B

【図１１】

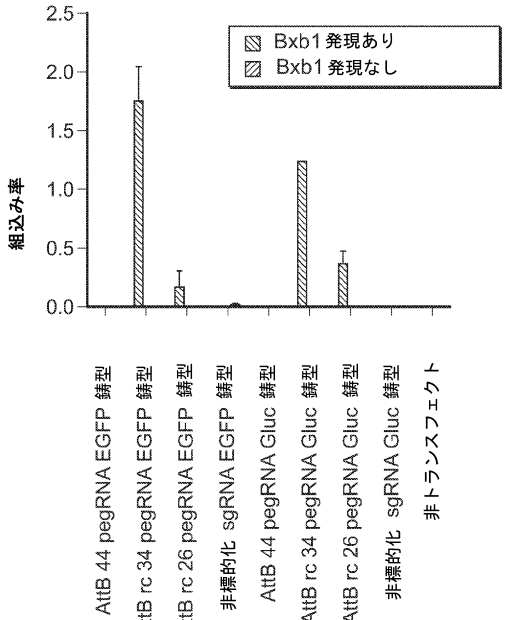


FIG. 11

【図１２】

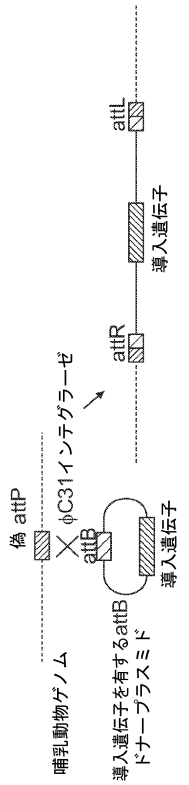


FIG. 12

【図１３】

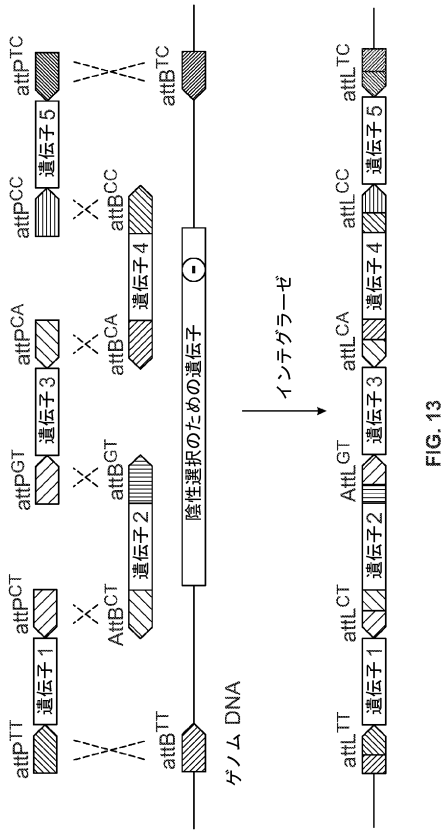


FIG. 13

【図１４Ａ】

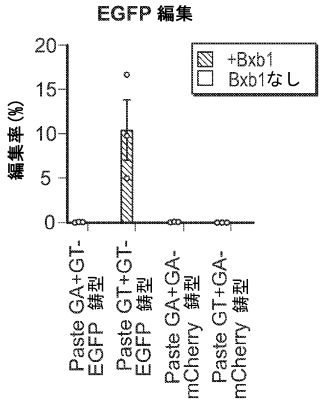


FIG. 14A

【図１４Ｂ】

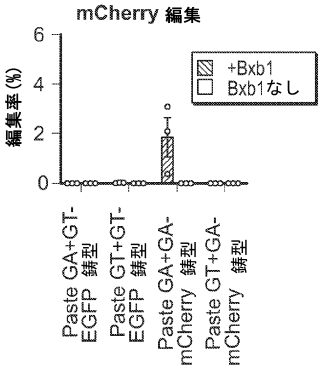


FIG. 14B

【図１５Ａ】

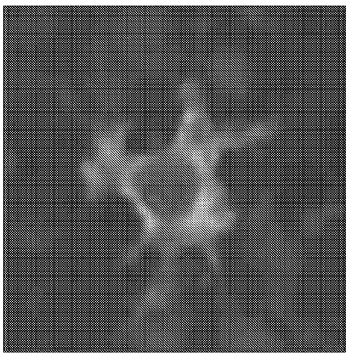


FIG. 15A

【図１５Ｂ】

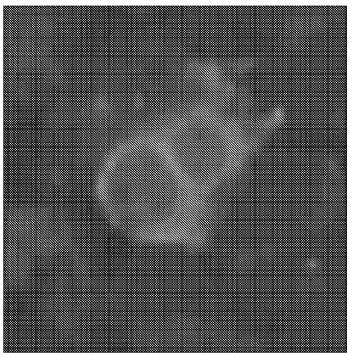


FIG. 15B

【図１６Ａ】

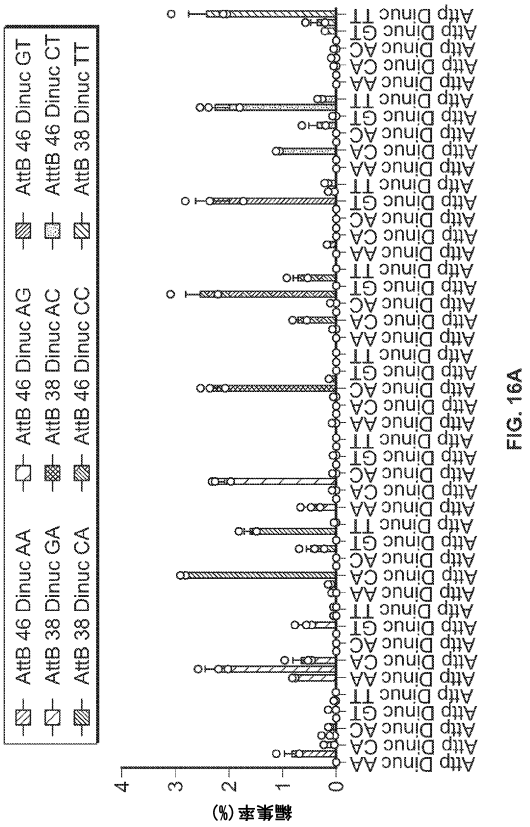


FIG. 16A

【図１６Ｂ】

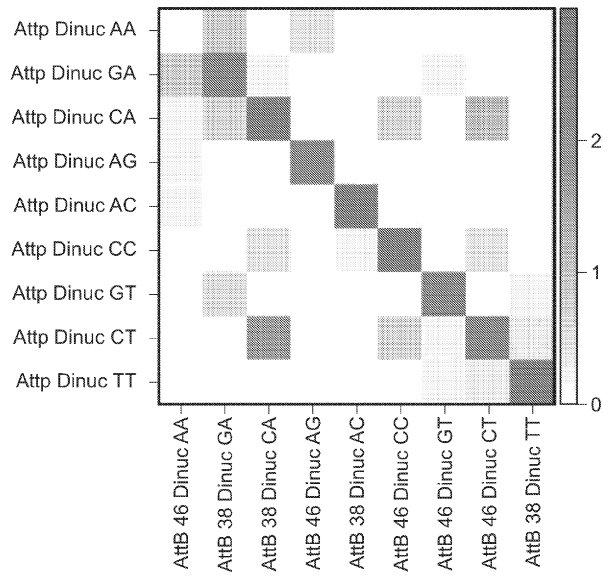


FIG. 16B

【図１７】

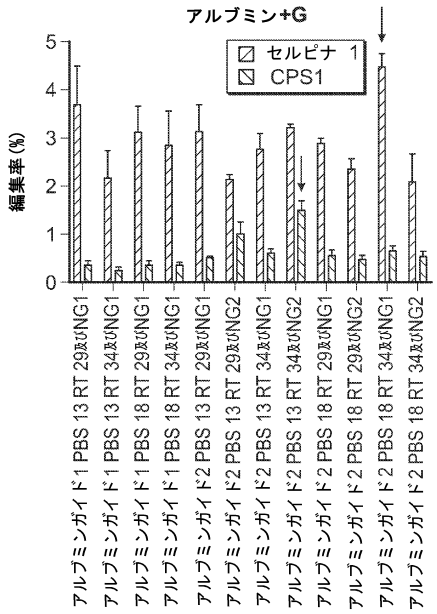


FIG. 17

【図１８】

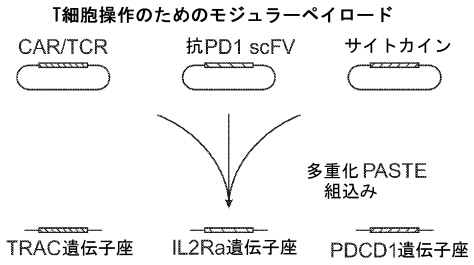


FIG. 18

【図１９】

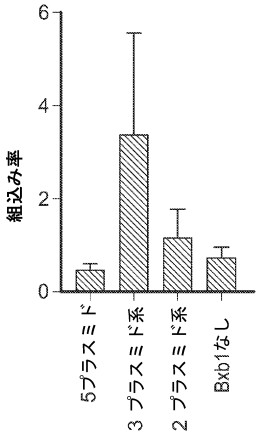


FIG. 19

【図２０】

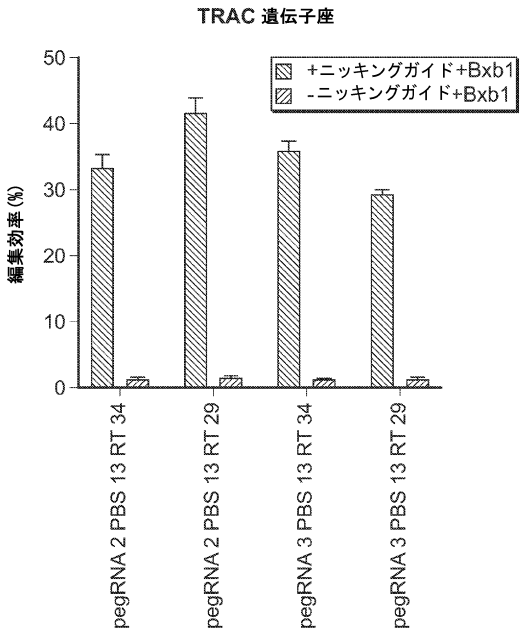


FIG. 20

【図２１Ａ】

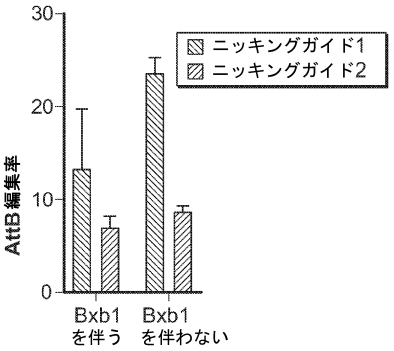


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

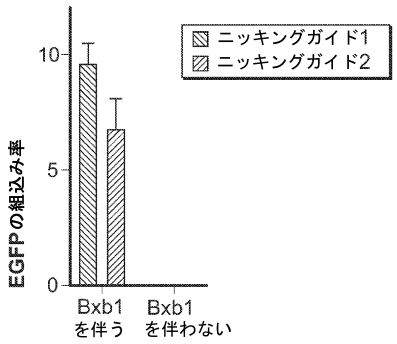


FIG. 21B

【図２１Ｃ】

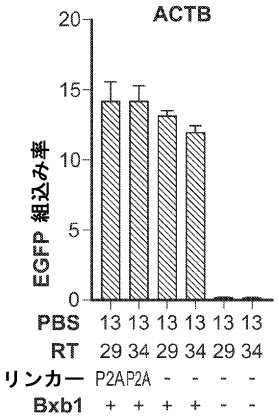


FIG. 21C

【図２２Ａ】

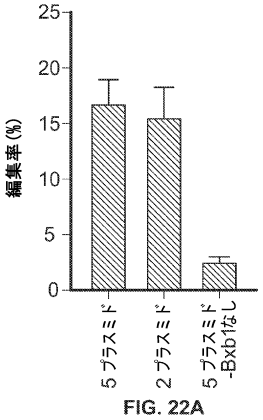


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

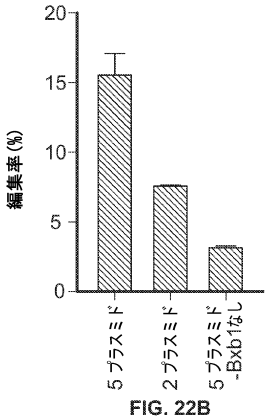


FIG. 22B

【図２３Ａ】

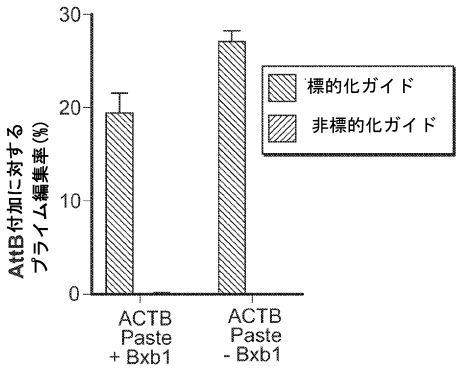


FIG. 23A

【図２３Ｂ】

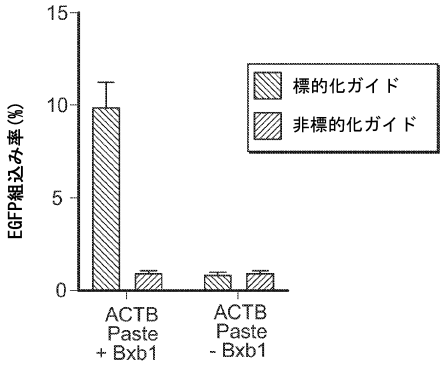


FIG. 23B

【図２３Ｃ】

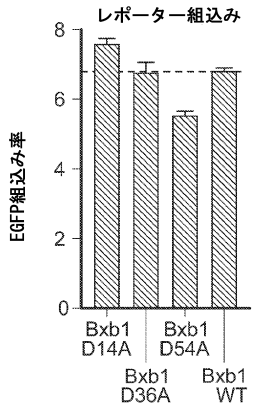


FIG. 23C

【図２４Ａ】

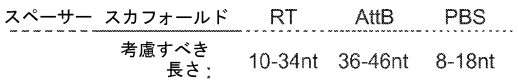


FIG. 24A

【図２４Ｂ】

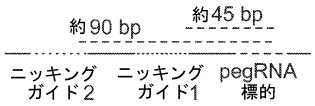


FIG. 24B

【図２５Ａ】

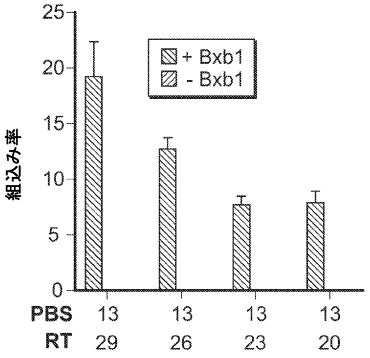


FIG. 25A

【図２５Ｂ】

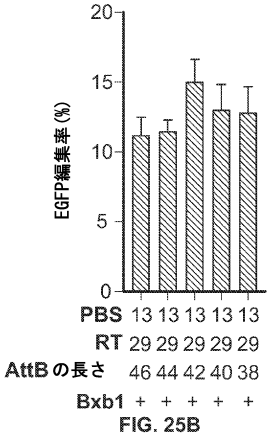


FIG. 25B

【図２５Ｃ】

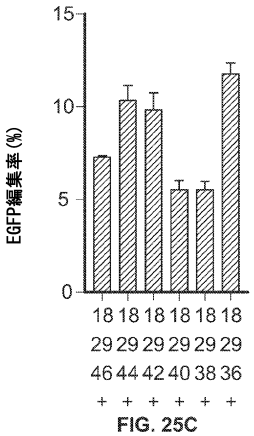


FIG. 25C

【図２５Ｄ】

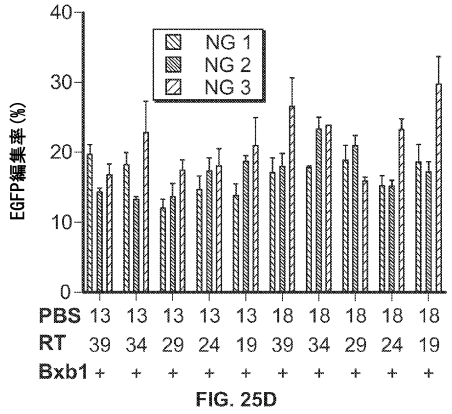


FIG. 25D

【図２５Ｅ】

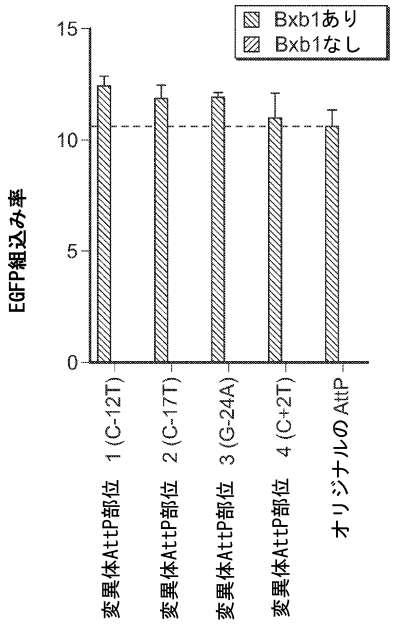


FIG. 25E

【図２５Ｆ】

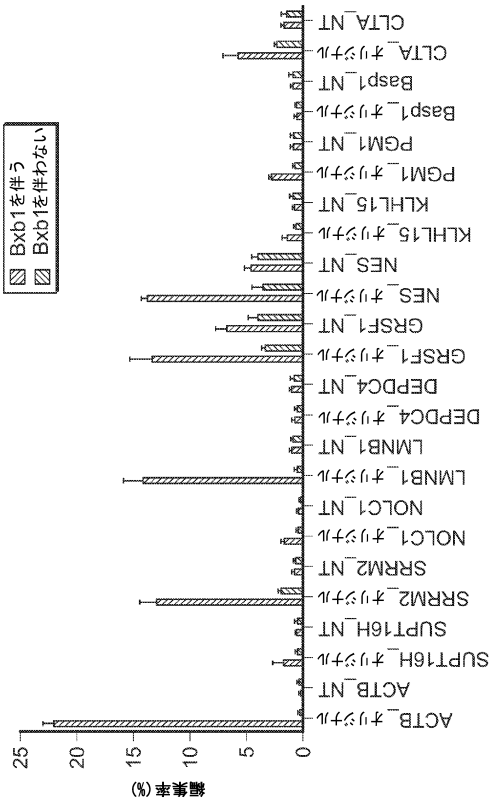


FIG. 25F

【図２６Ａ】

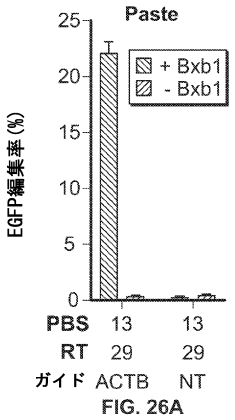


FIG. 26A

【図２６Ｂ】

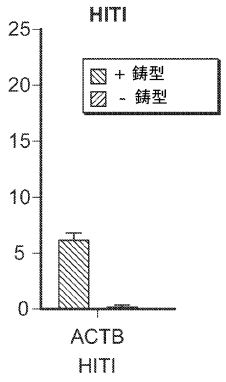


FIG. 26B

【図２６Ｃ】

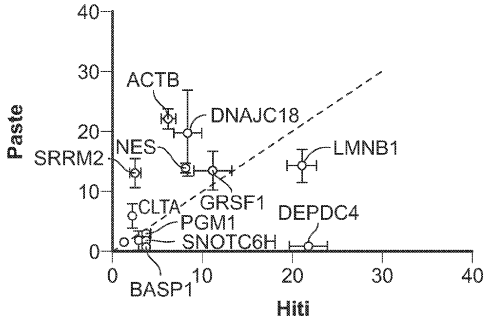


FIG. 26C

【図２６Ｄ】

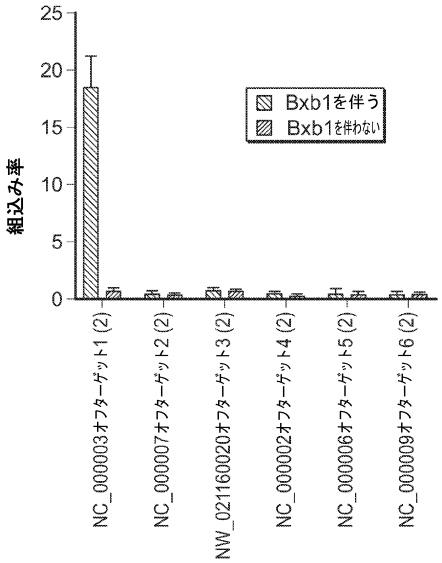


FIG. 26D

【図２６Ｅ】

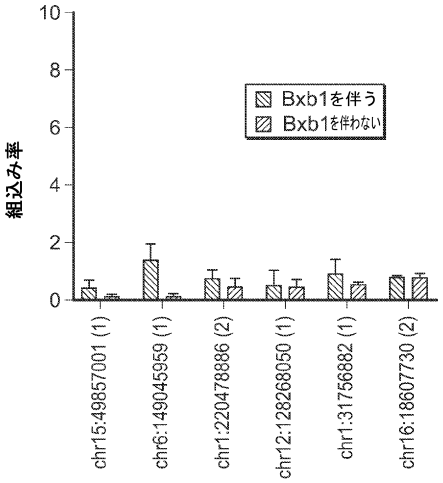


FIG. 26E

【図２６Ｆ】

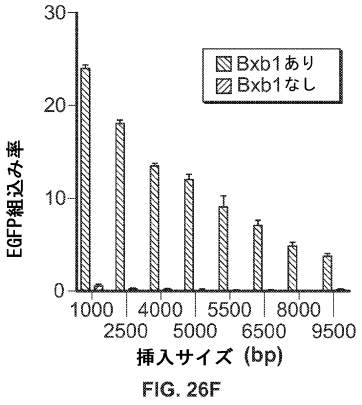


FIG. 26F

【図２７Ａ】

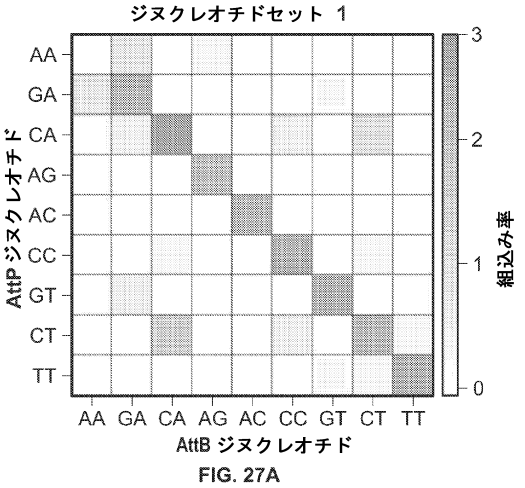


FIG. 27A

【図２７Ｂ】

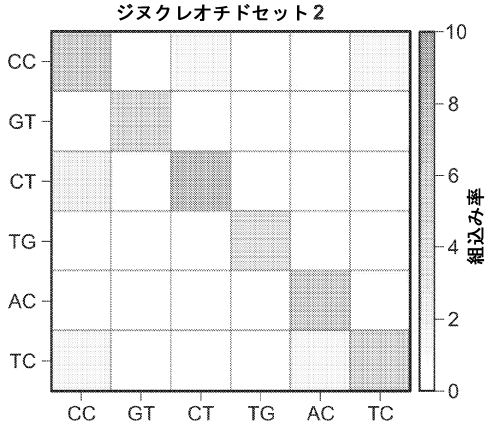


FIG. 27B

【図２７Ｃ】

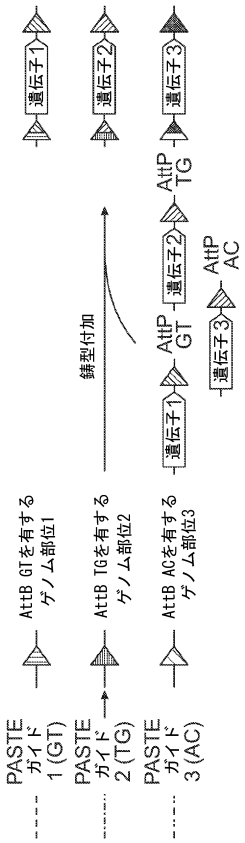


FIG. 27C

【図２８Ａ】

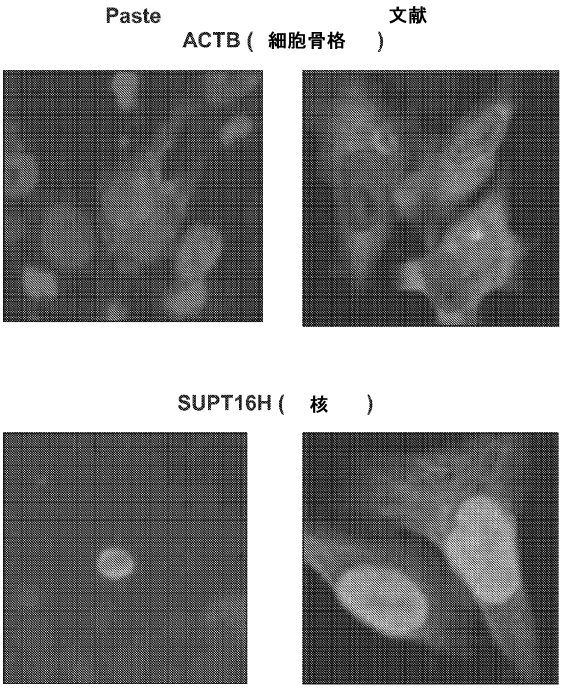


FIG. 28A

【図２８Ｂ】

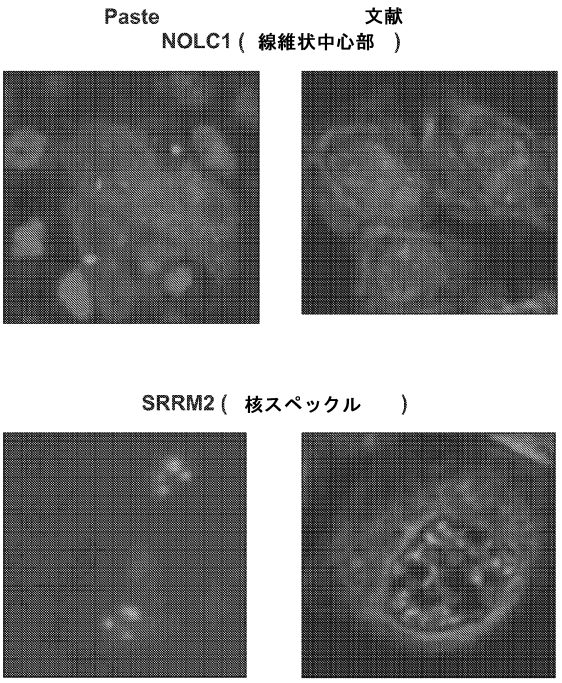


FIG. 28B

【図２８Ｃ】

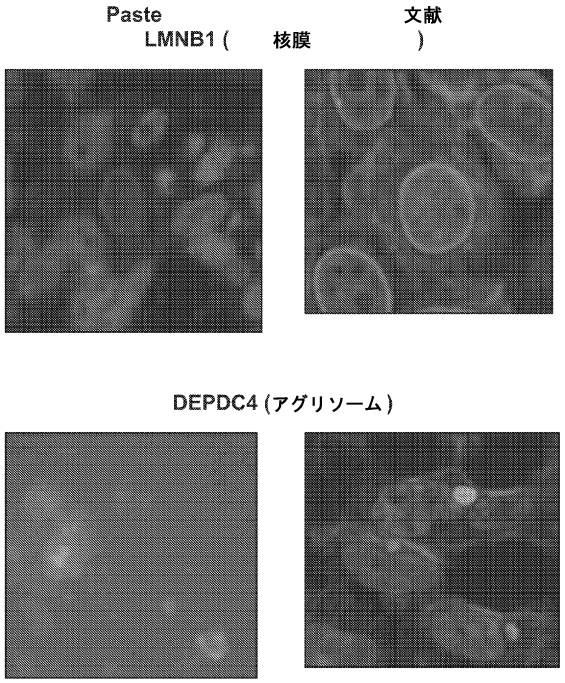


FIG. 28C

【図２８Ｄ】

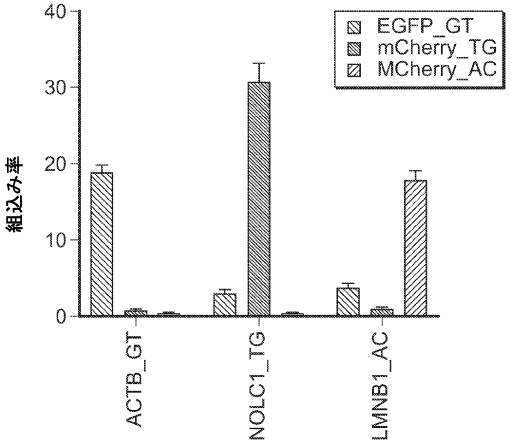


FIG. 28D

【図２８Ｅ】

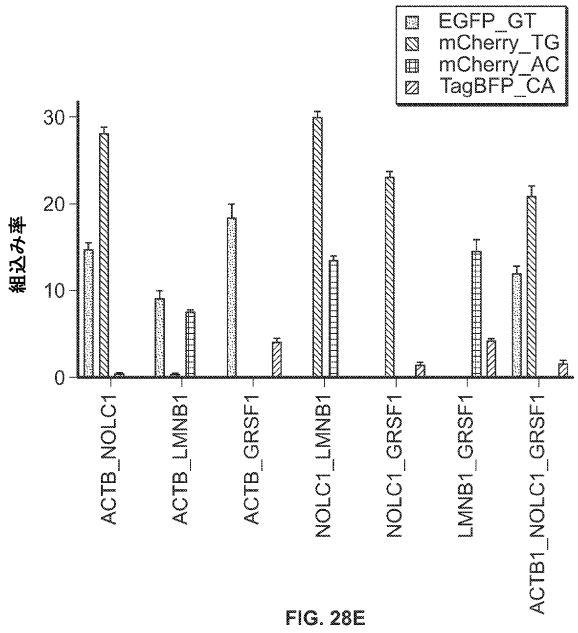


FIG. 28E

【図２８Ｆ】

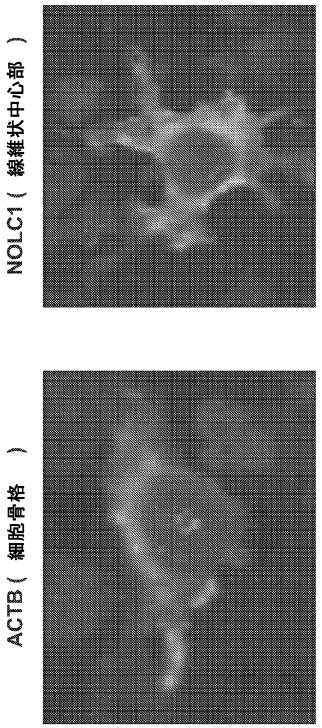


FIG. 28F

【図２８Ｇ】

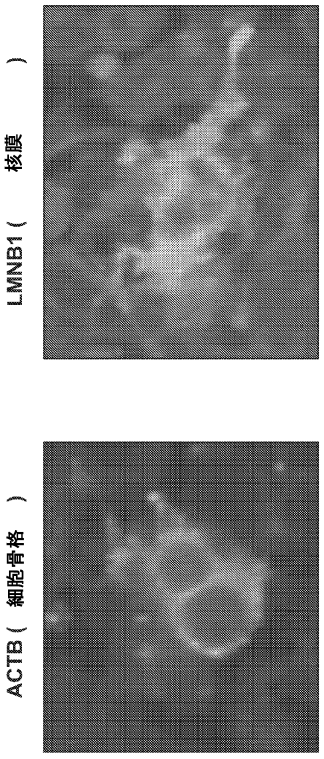


FIG. 28G

【図２９Ａ】

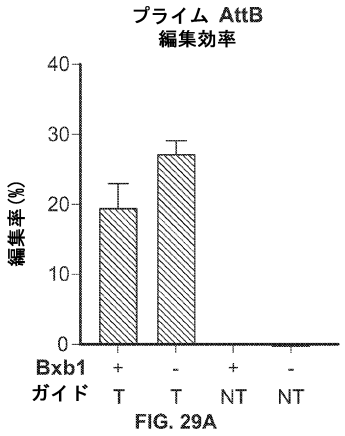


FIG. 29A

【図２９Ｂ】

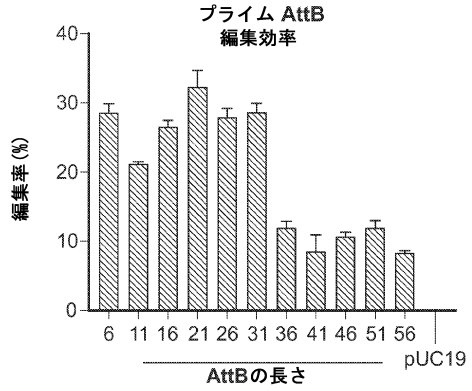


FIG. 29B

【図２９Ｃ】

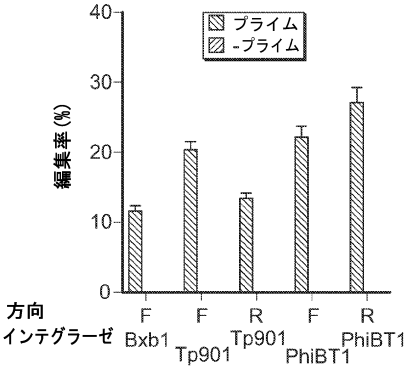


FIG. 29C

【図２９Ｄ】

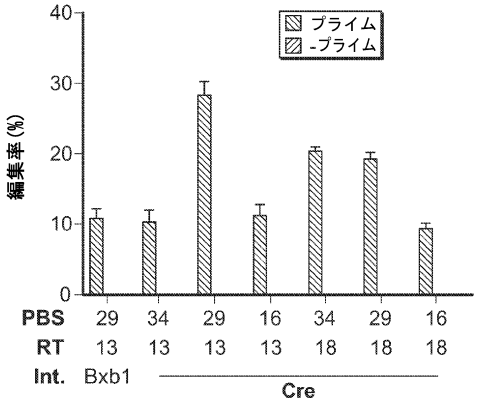


FIG. 29D

【図２９Ｅ】

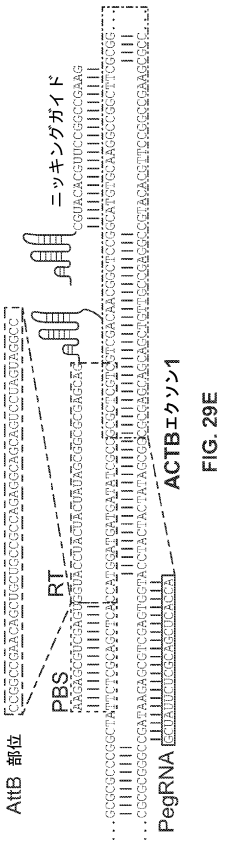


FIG. 29E

【図２９Ｆ】

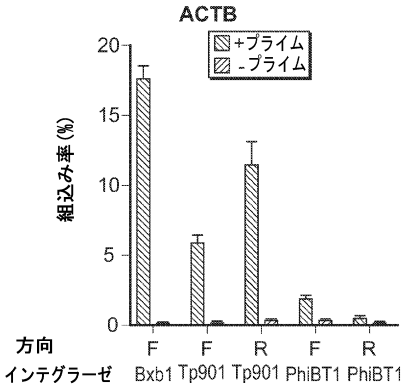


FIG. 29F

【図２９Ｇ】

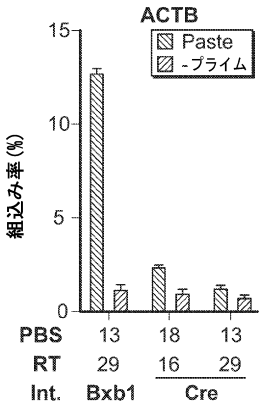


FIG. 29G

【図２９Ｈ】

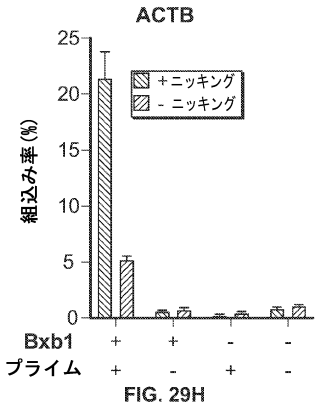


FIG. 29H

【図２９Ｉ】

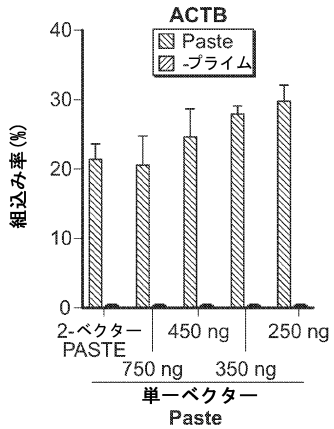


FIG. 29I

【図２９Ｊ】

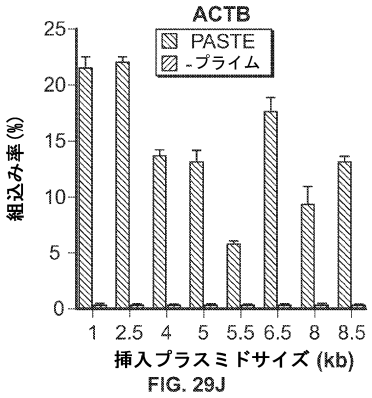


FIG. 29J

【図２９Ｋ】

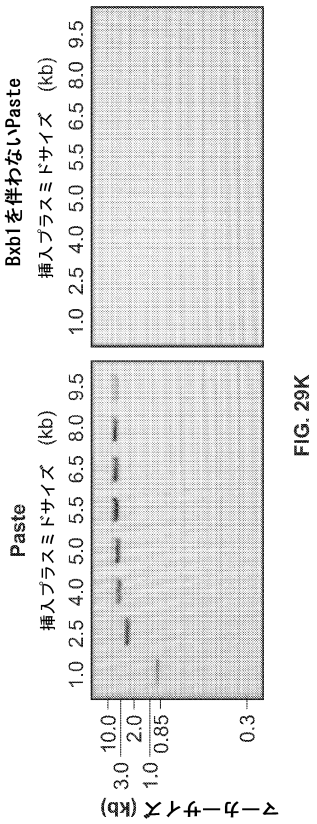


FIG. 29K

【図３０Ａ】

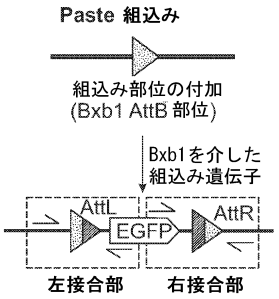


FIG. 30A

【図３０Ｂ】

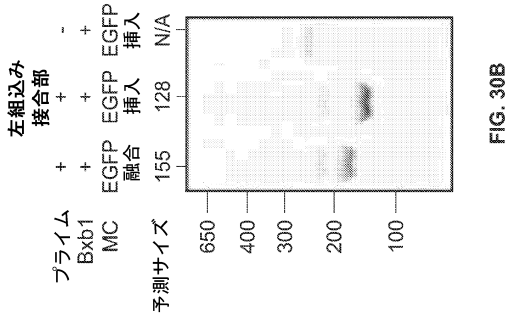


FIG. 30B

【図３０Ｃ】

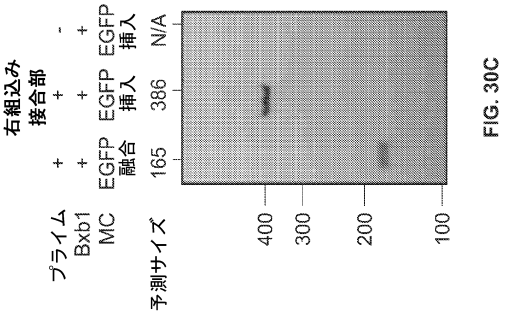


FIG. 30C

【図３０Ｄ】

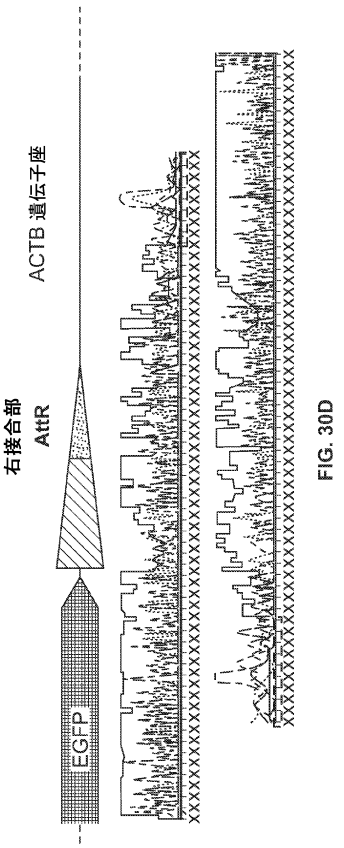


FIG. 30D

【図３０Ｅ】

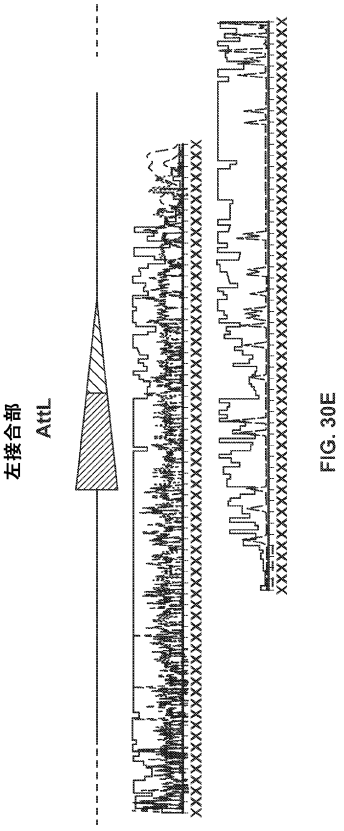


FIG. 30E

【図３１Ａ】

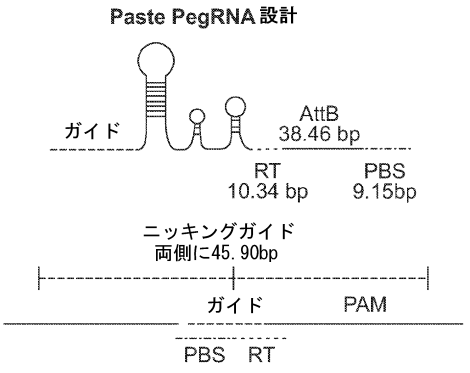


FIG. 31A

【図３１Ｂ】

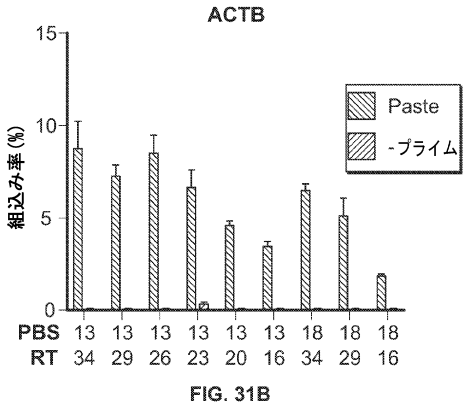


FIG. 31B

【図３１Ｃ】

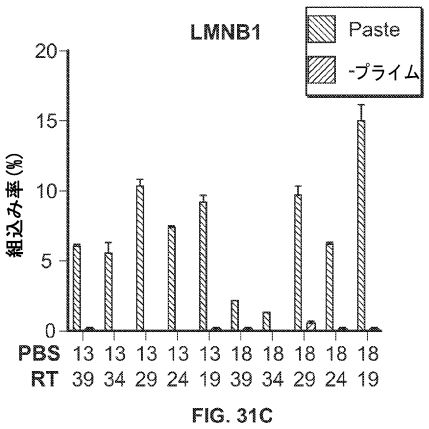


FIG. 31C

【図３１Ｄ】

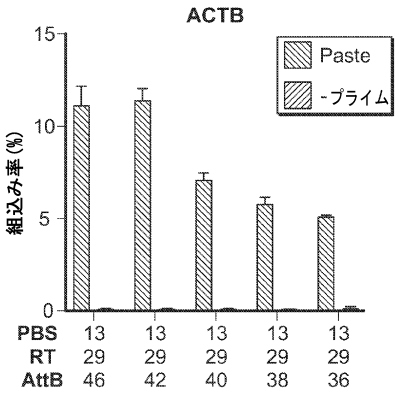


FIG. 31D

【図３１Ｅ】

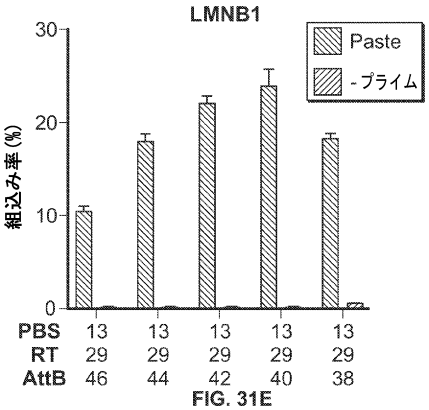


FIG. 31E

【図３１Ｆ】

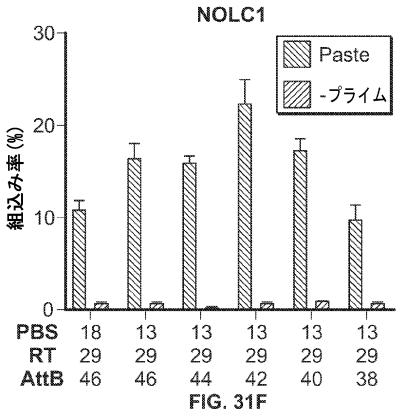


FIG. 31F

【図３１Ｇ】

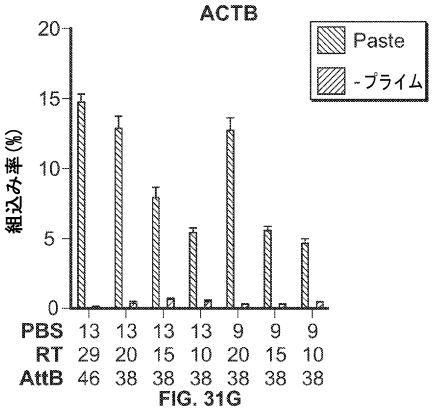


FIG. 31G

【図３１Ｈ】

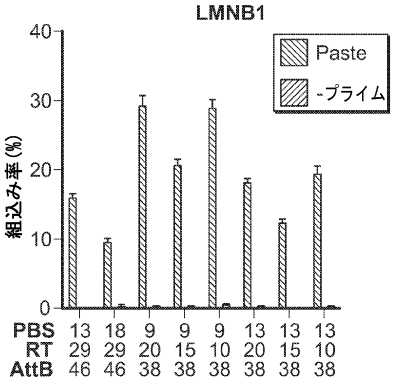


FIG. 31H

【図３１Ｉ】

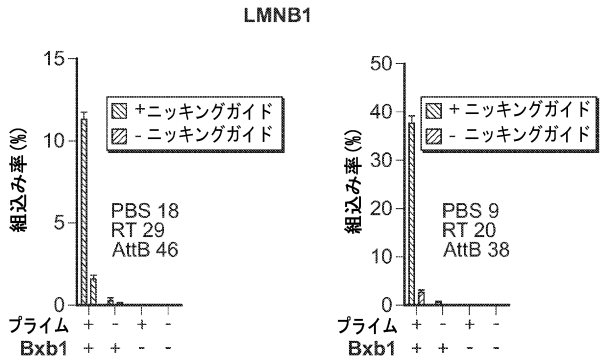


FIG. 31I

【図３２Ａ】

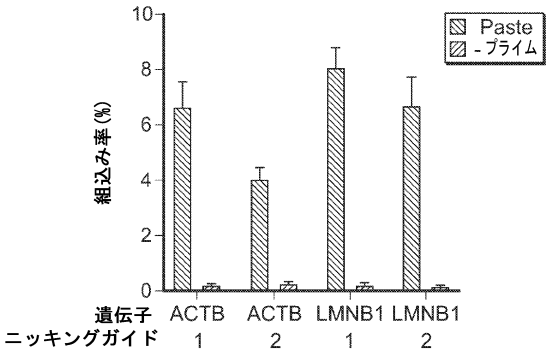


FIG. 32A

【図３２Ｂ】

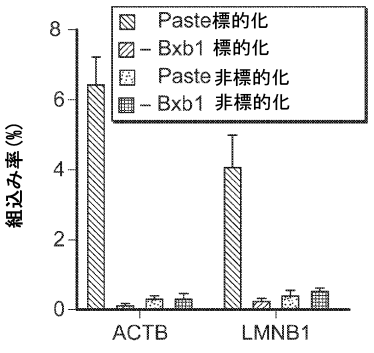


FIG. 32B

【図３３Ａ】

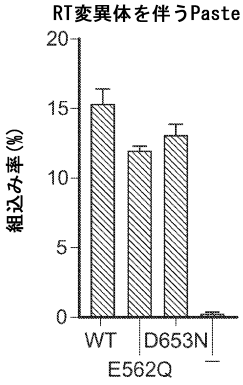


FIG. 33A

【図３３Ｂ】

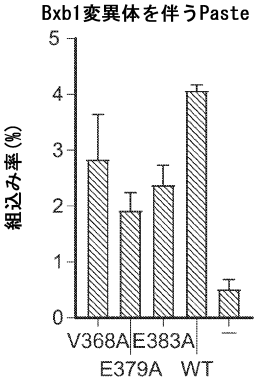


FIG. 33B

【図３４Ａ】

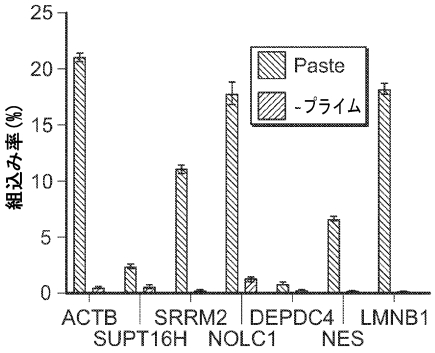


FIG. 34A

【図３４Ｂ】

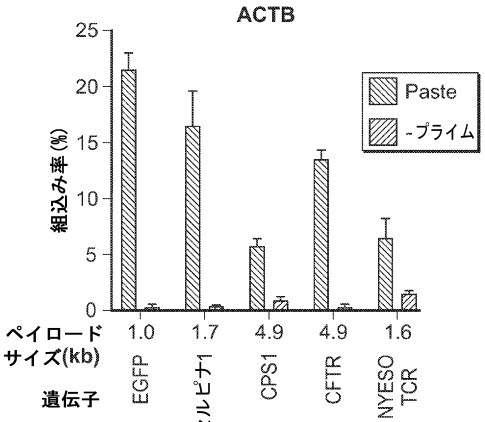


FIG. 34B

【図３４Ｃ】

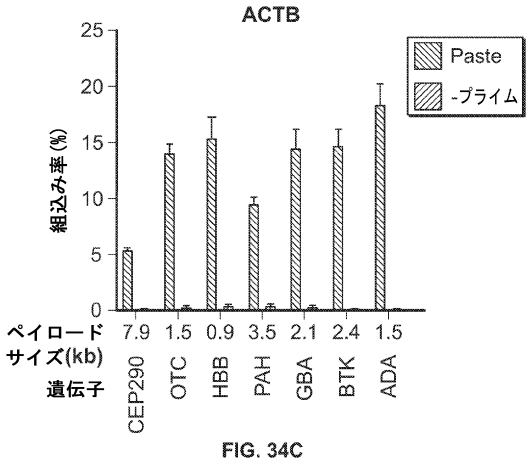


FIG. 34C

【図３４Ｄ】

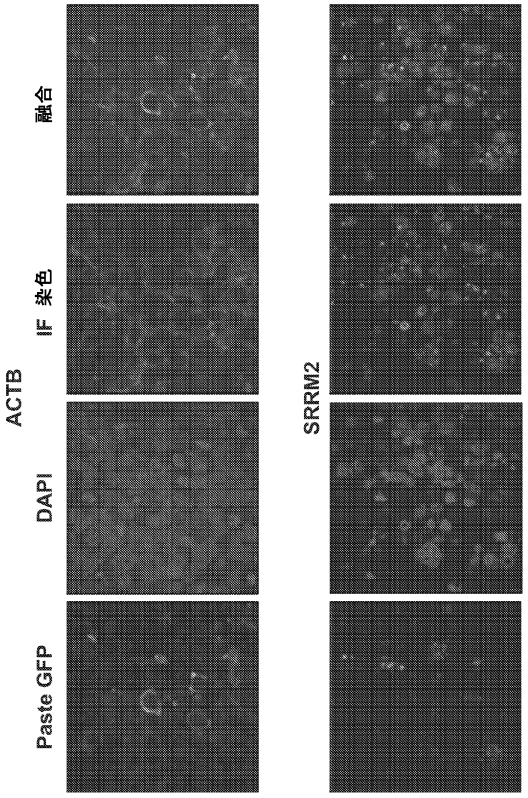


FIG. 34D

【図３４Ｅ】

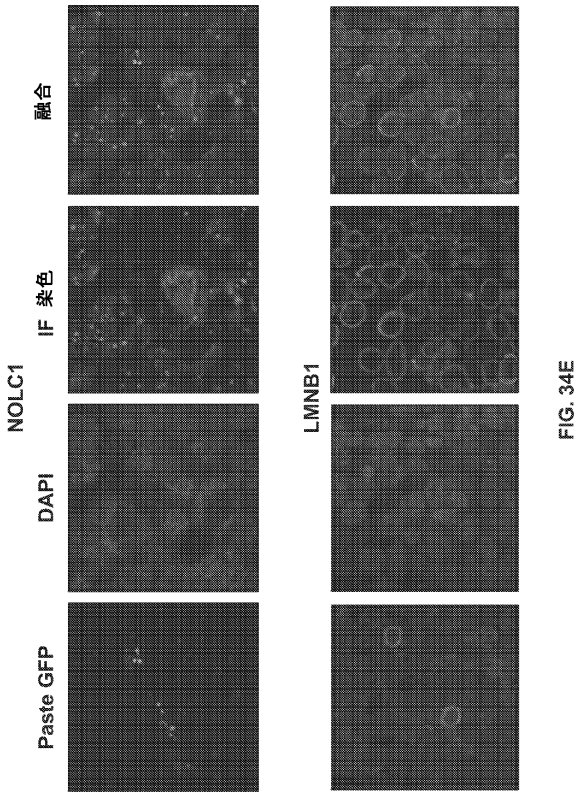


FIG. 34E

【図３５】

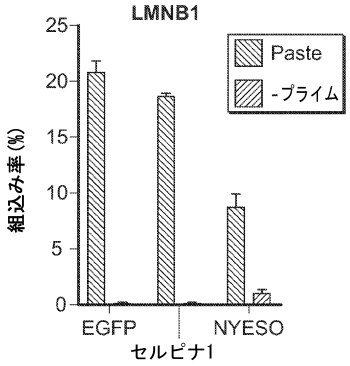


FIG. 35

【図３６Ａ】

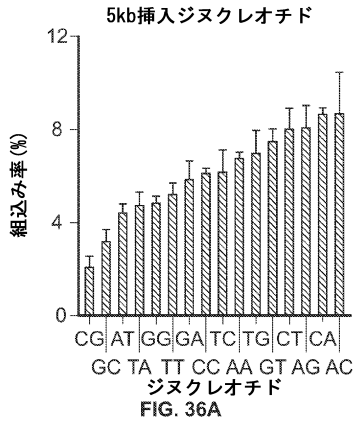


FIG. 36A

【図３６Ｂ】

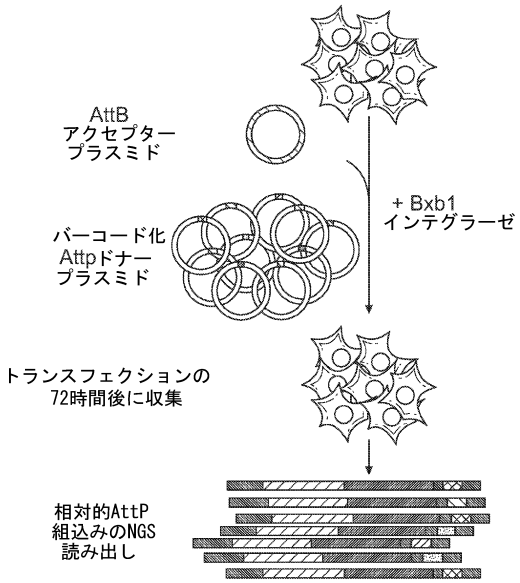


FIG. 36B

【図３６Ｃ】

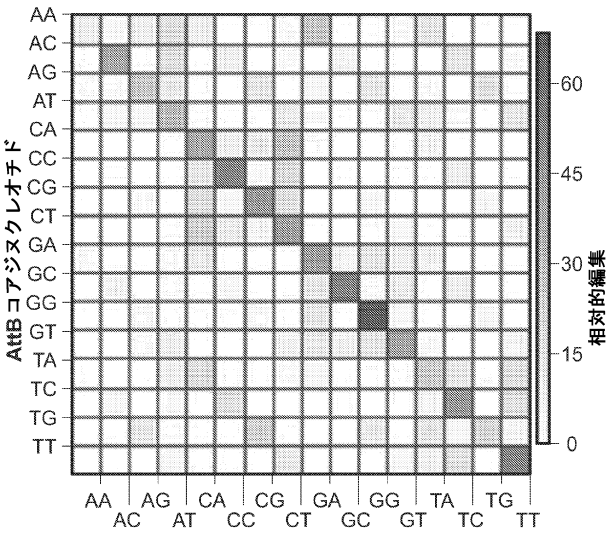


FIG. 36C

【図３６Ｄ】

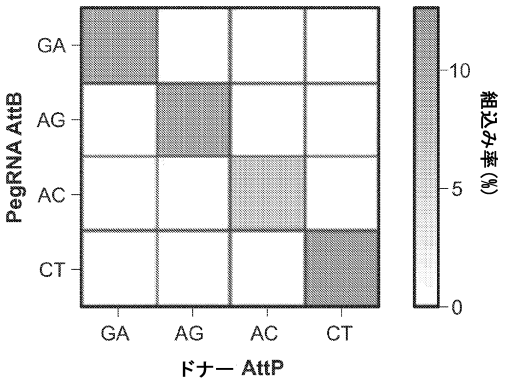


FIG. 36D

【図３７】

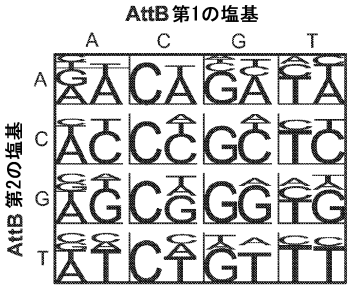


FIG. 37

【図３８Ａ】

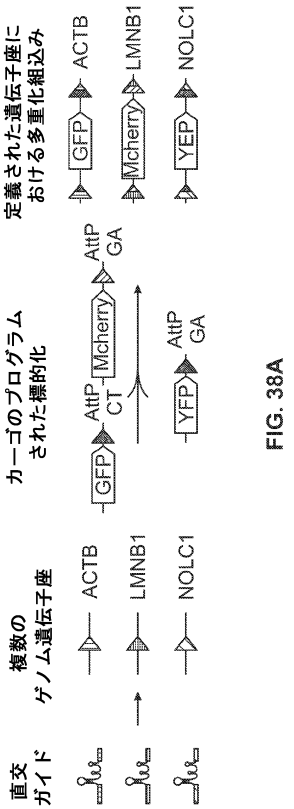


FIG. 38A

【図３８Ｂ】

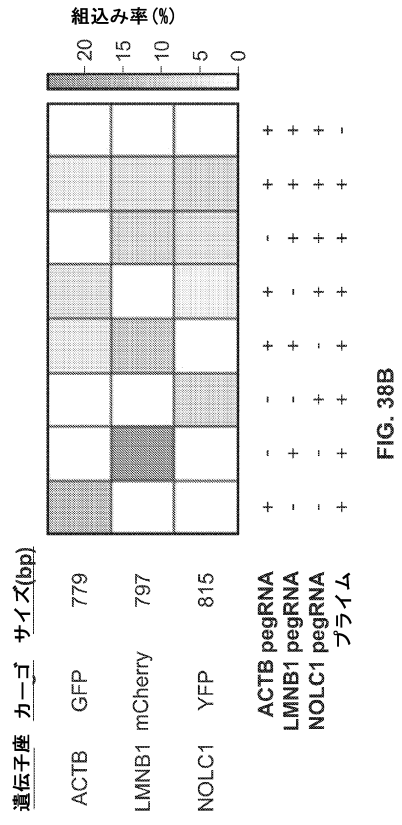


FIG. 38B

【図３９Ａ】

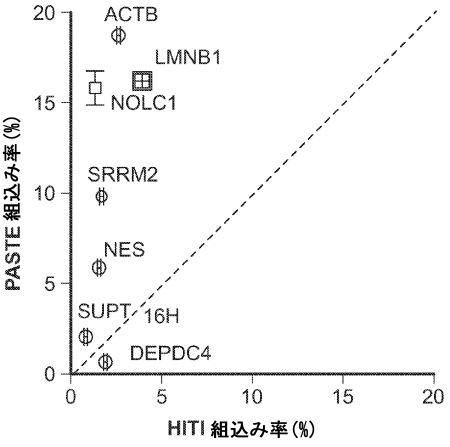


FIG. 39A

【図３９Ｂ】

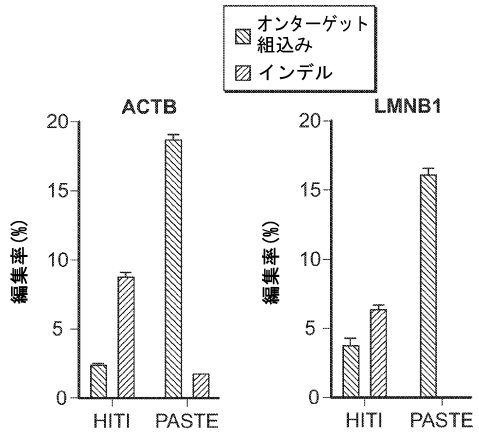


FIG. 39B

【図３９Ｃ】

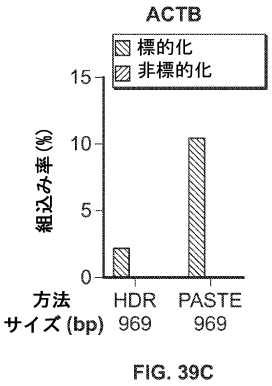


FIG. 39C

【図３９Ｄ】

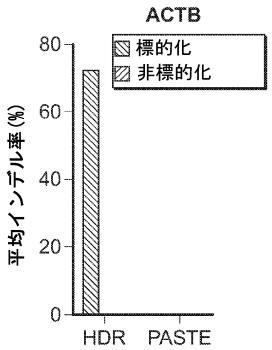


FIG. 39D

【図３９Ｅ】

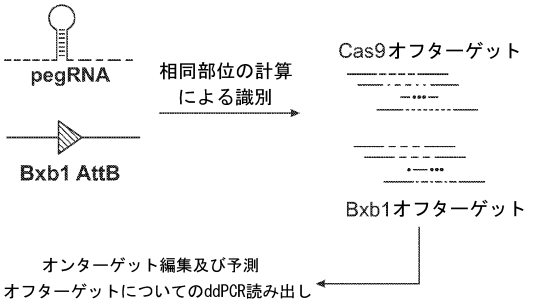


FIG. 39E

【図３９Ｆ】

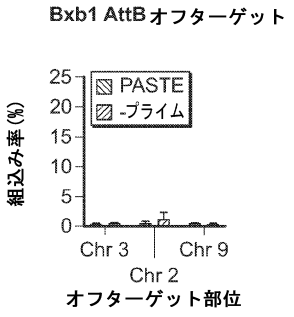


FIG. 39F

【図３９Ｇ】

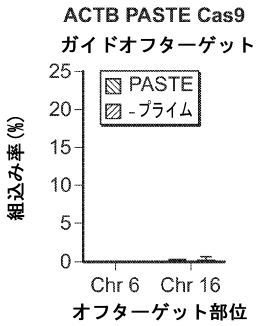


FIG. 39G

【図３９Ｈ】

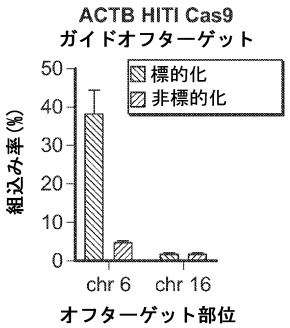


FIG. 39H

【図３９Ｉ】

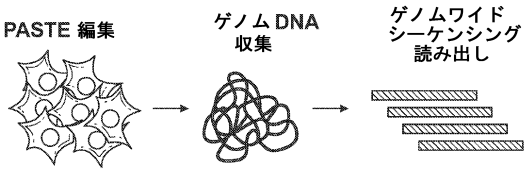


FIG. 39I

【図３９Ｊ】

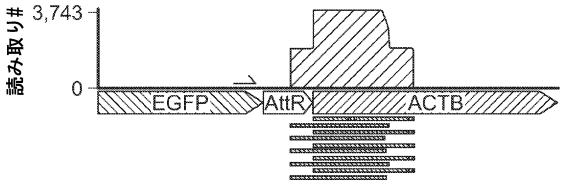


FIG. 39J

【図３９Ｋ】

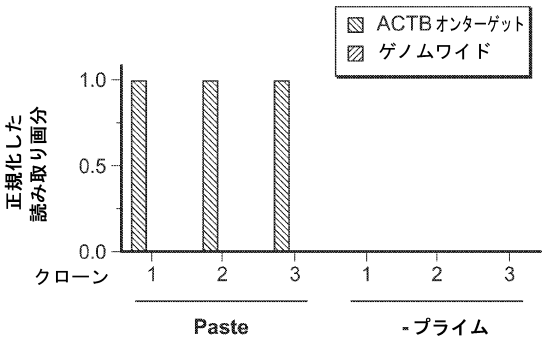


FIG. 39K

【図３９Ｌ】

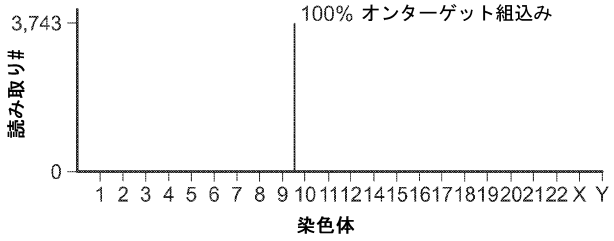


FIG. 39L

【図４０Ａ】

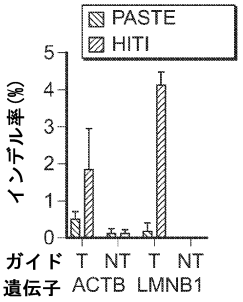


FIG. 40A

【図４０Ｂ】

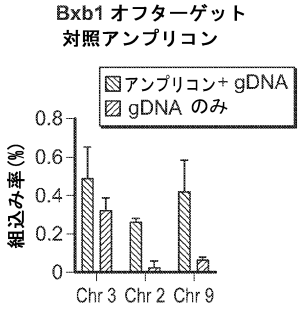


FIG. 40B

【図４０Ｃ】

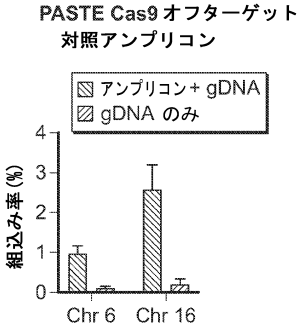


FIG. 40C

【図４０Ｄ】

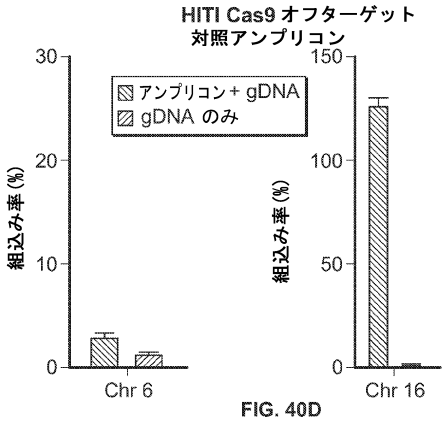


FIG. 40D

【図４１Ａ】

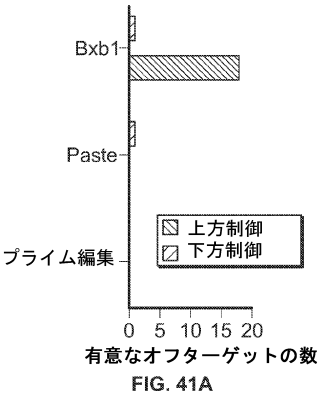


FIG. 41A

【図４１Ｂ】

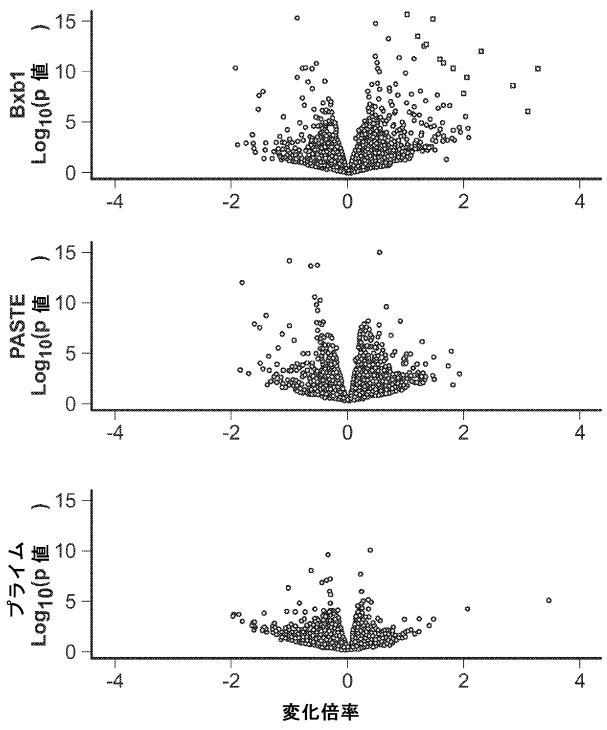


FIG. 41B

【図４１Ｃ】

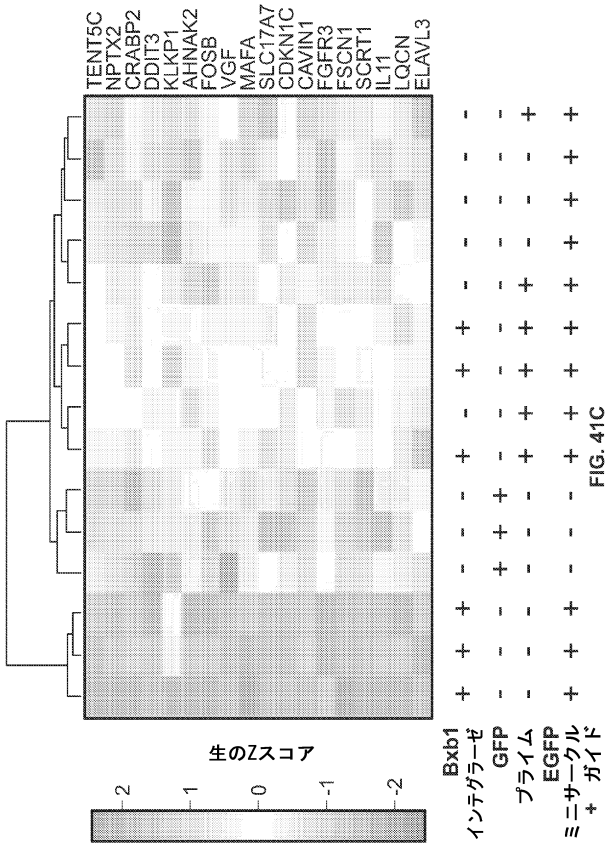


FIG. 41C

【図４２Ａ】

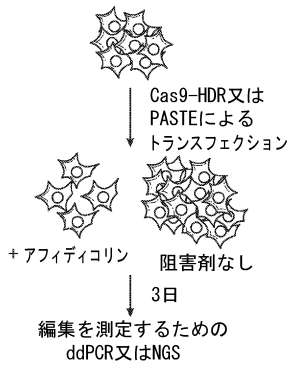


FIG. 42A

【図４２Ｂ】

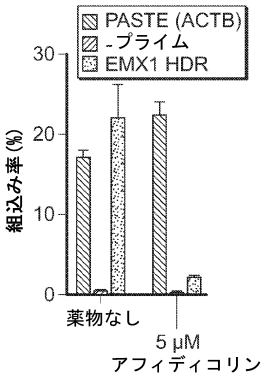


FIG. 42B

【図４２Ｃ】

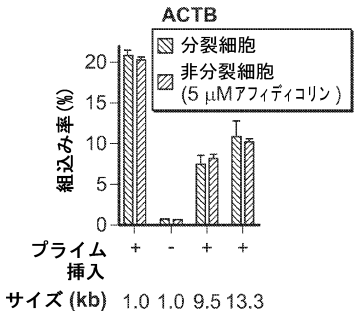


FIG. 42C

【図４２Ｄ】

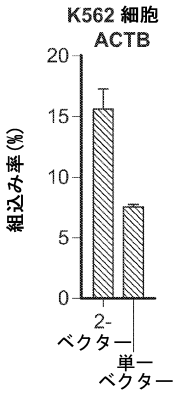


FIG. 42D

【図４２Ｅ】

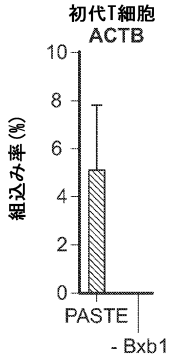


FIG. 42E

【図４２Ｆ】

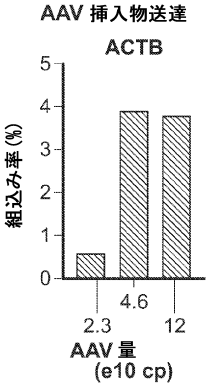


FIG. 42F

【図４２Ｇ】

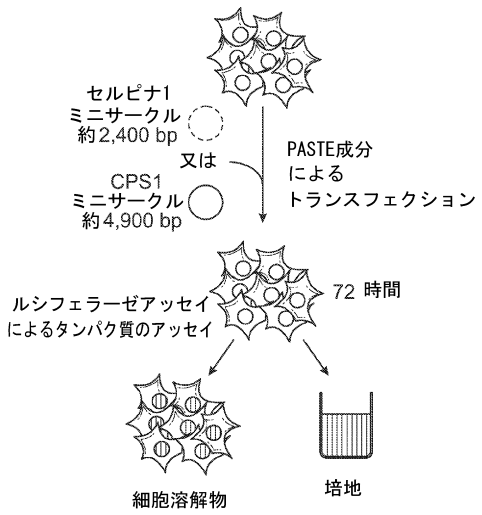


FIG. 42G

【図４２Ｈ】

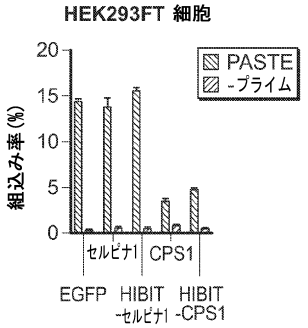


FIG. 42H

【図４２Ｉ】

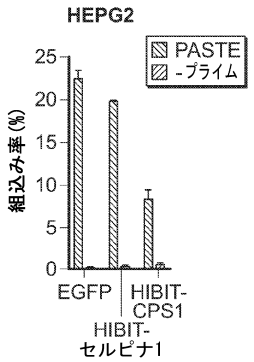


FIG. 42I

【図４２Ｊ】

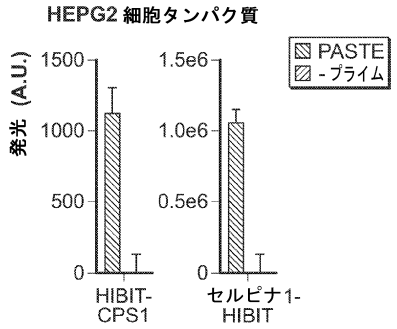


FIG. 42J

【図４２Ｋ】

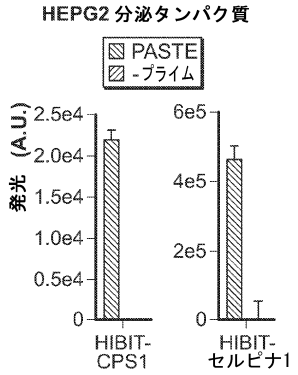


FIG. 42K

【図４３Ａ】

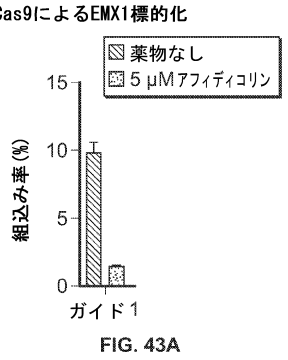


FIG. 43A

【図４３Ｂ】

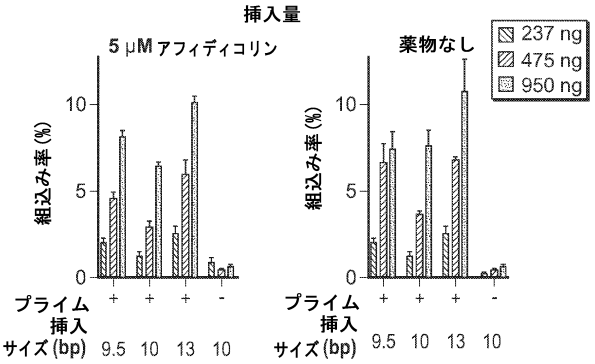


FIG. 43B

【図４３Ｃ】

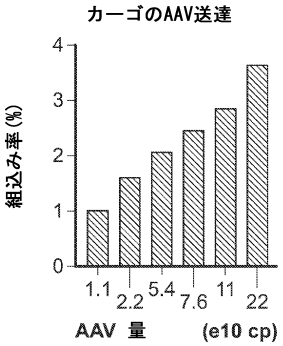


FIG. 43C

【図４４Ａ】

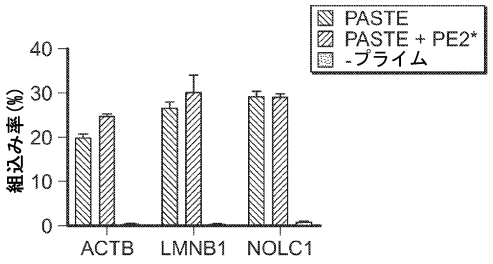


FIG. 44A

【図４４Ｂ】

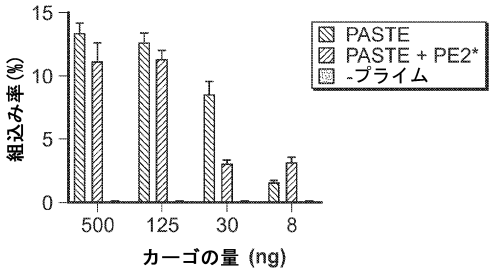


FIG. 44B

【図４５】

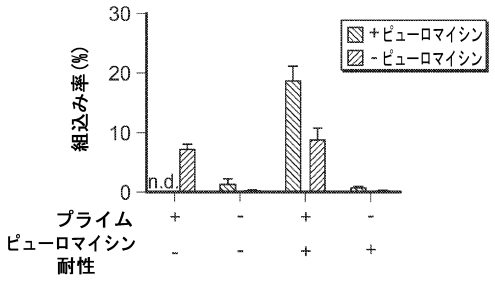


FIG. 45

【図４６Ａ】

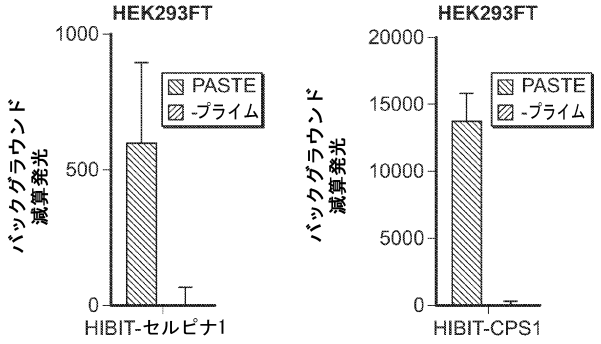


FIG. 46A

【図４６Ｂ】

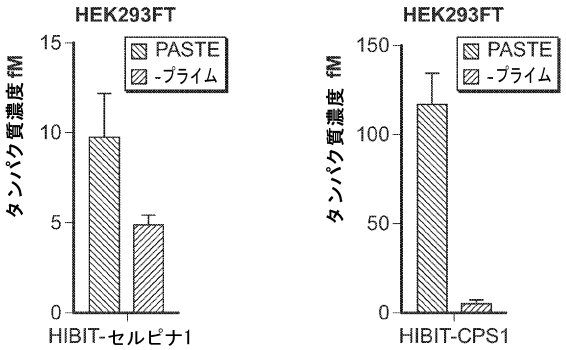


FIG. 46B

【図４７Ａ】

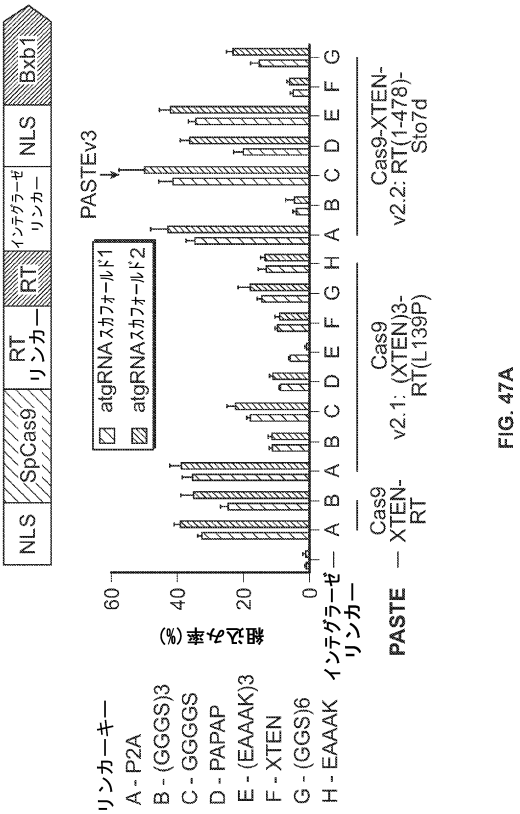


FIG. 47A

【図４７Ｂ】

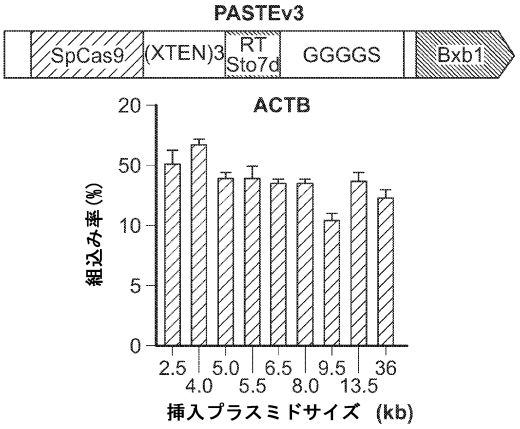


FIG. 47B

【図４８Ａ】

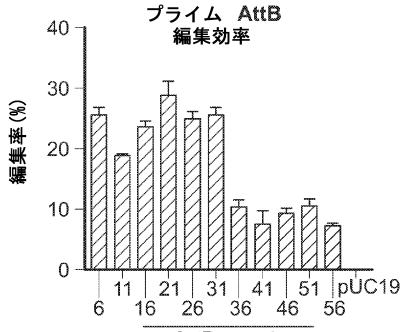


FIG. 48A

【図４８Ｂ】

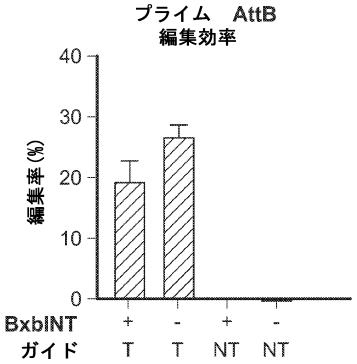


FIG. 48B

【図４８Ｃ】

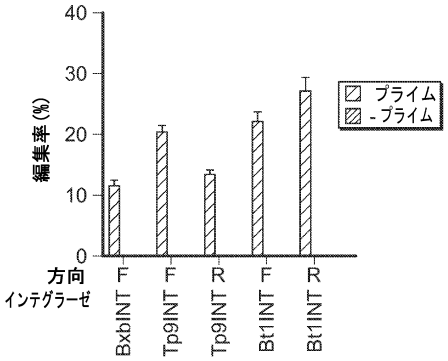


FIG. 48C

【図４８Ｄ】

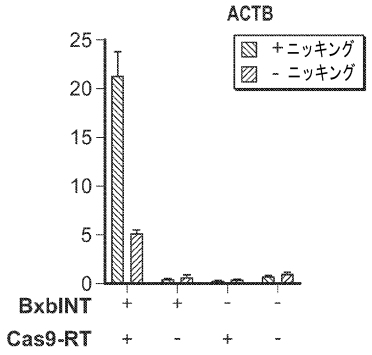


FIG. 48D

【図４９Ａ】

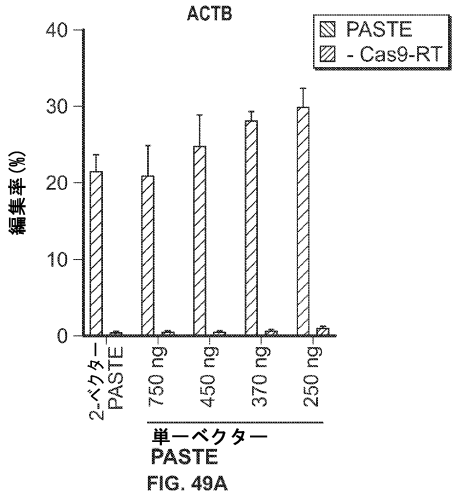


FIG. 49A

【図４９Ｂ】

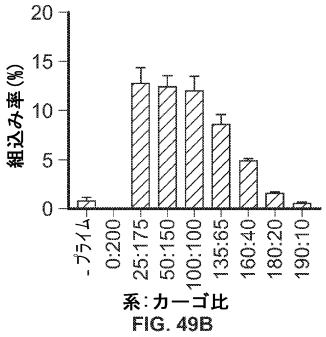


FIG. 49B

【図４９Ｃ】

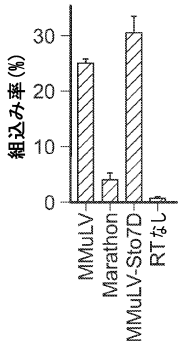


FIG. 49C

【図４９Ｄ】

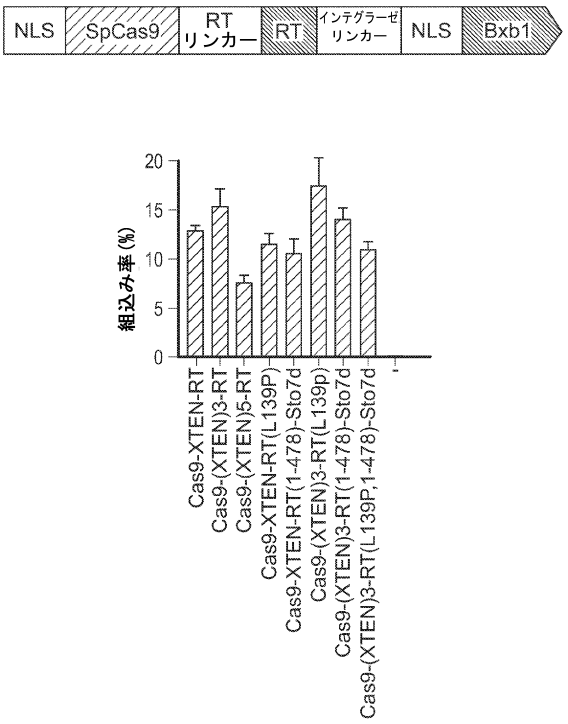


FIG. 49D

【図４９Ｅ】

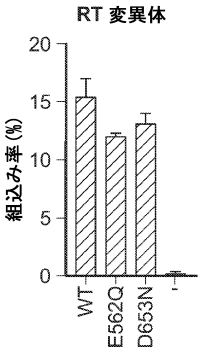


FIG. 49E

【図４９Ｆ】

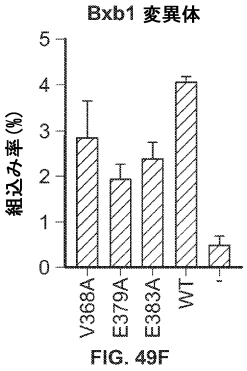


FIG. 49F

【図５０Ａ】

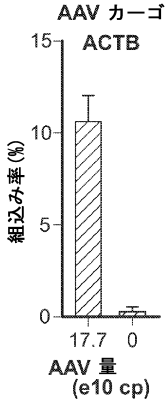


FIG. 50A

【図５０Ｂ】

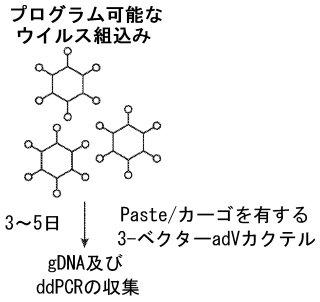


FIG. 50B

【図５０Ｃ】

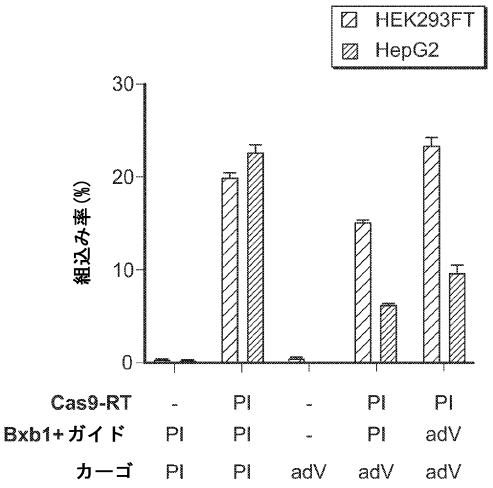


FIG. 50C

【図５０Ｄ】

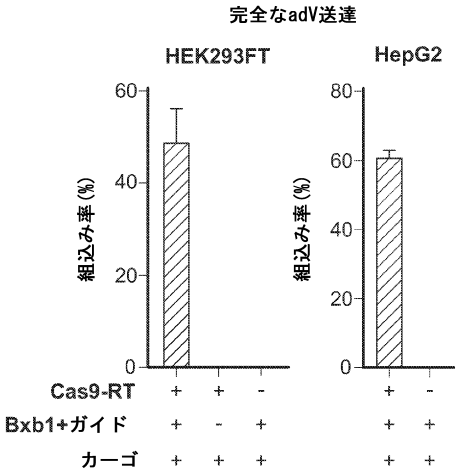


FIG. 50D

【図５０Ｅ】

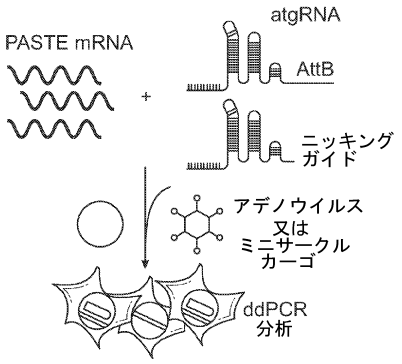


FIG. 50E

【図５０Ｆ】

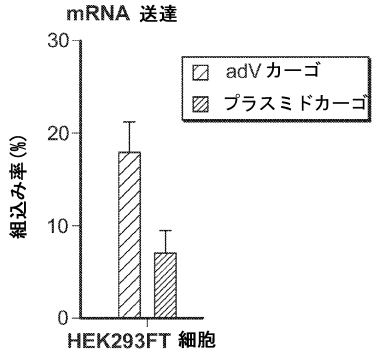


FIG. 50F

【図５０Ｇ】

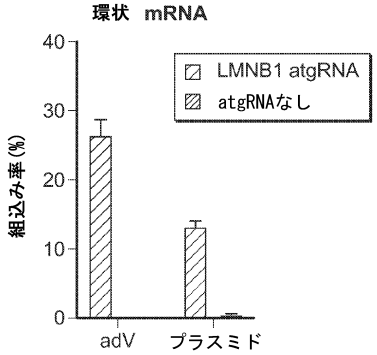


FIG. 50G

【図５０Ｈ】

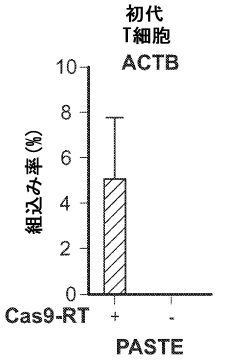


FIG. 50H

【図５０Ｉ】

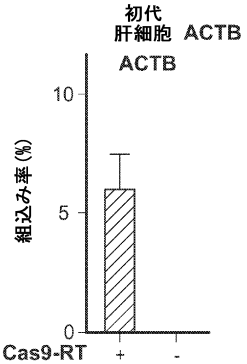


FIG. 50I

【図５１Ａ】

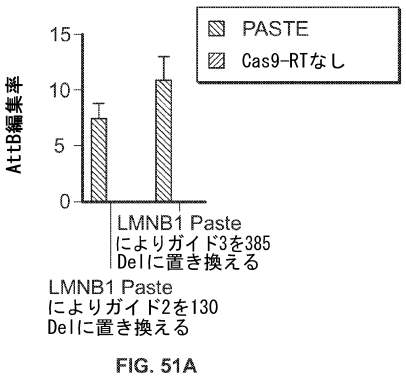


FIG. 51A

【図５１Ｂ】

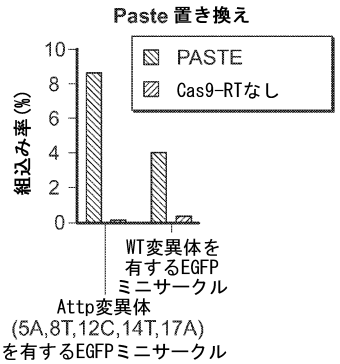


FIG. 51B

【配列表】

2023546597000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/113 C12N15/90 C12N9/12 C12N9/22 A61K31/7088
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

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, EMBL, 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 2020/191234 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 24 September 2020 (2020-09-24)	1-10, 15-31, 34-41, 73-77, 89-91
Y	paragraphs [0126], [0133], [0457] - [0462], [0525] - [0527], [0540], [0684], [0688], [0783], [0951], [1014]; figures 64,65; example 17 paragraphs [1011] - [1035], [1043], [1261], [1291], [1292], [2321]	11-14, 32,33, 42-72, 78-88

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 February 2022	23/02/2022

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056006

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 2020/191245 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 24 September 2020 (2020-09-24)	1-10, 15-31, 34-41, 73-77, 89-91
Y	paragraphs [0126], [0133], [0460] - [0462], [0525], [0684], [0688], [0783], [0951]; figures 64,65; example 17 paragraphs [1011] - [1035], [1043], [1286], [1287], [1504], [1508], [1992], [2321]	11-14, 32,33, 42-72, 78-88
A	US 2015/071898 A1 (LIU DAVID R [US] ET AL) 12 March 2015 (2015-03-12) claims 1-12; figure 5	1-91
A	ANZALONE ANDREW V ET AL: "Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP US, NEW YORK, vol. 38, no. 7, 22 June 2020 (2020-06-22), pages 824-844, XP037622140, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/S41587-020-0561-9 [retrieved on 2020-06-22] figure 6	1-91
A	WO 2020/191233 A1 (BROAD INST INC [US]; HARVARD COLLEGE [US]) 24 September 2020 (2020-09-24) paragraphs [0252], [0684], [0688], [1011] - [1035]; figures 64,65; example 17	1-91
A	US 2014/349400 A1 (JAKIMO NOAH [US] ET AL) 27 November 2014 (2014-11-27) claims 1-11; figures 6-9	1-91
A	ANGUS YIU-FAI LEE ET AL: "Conditional targeting of Ispd using paired Cas9 nickase and a single DNA template in mice", FEBS OPEN BIO, vol. 4, no. 1, 1 July 2014 (2014-07-01), pages 637-642, XP055516918, US ISSN: 2211-5463, DOI: 10.1016/j.fob.2014.06.007 figures 1,2	1-91

-/--

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MERRICK CHRISTINE A. ET AL: "Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 7, no. 2, 9 January 2018 (2018-01-09) , pages 299-310, XP55890510, Washington DC ,USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.7b00308 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acssynbio.7b00308> figures 1,3	1-91
A	MARA C INNISS ET AL: "A novel Bxb1 integrase RMCE system for high fidelity site-specific integration of mAb expression cassette in CHO Cells", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, JOHN WILEY, HOBOKEN, USA, vol. 114, no. 8, 14 March 2017 (2017-03-14), pages 1837-1846, XP071166358, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/BIT.26268 figures 1,2	1-91
T	Anzalone Andrew V. ET AL: "Programmable large DNA deletion, replacement, integration, and inversion with twin prime editing and site-specific recombinases", bioRxiv, 2 November 2021 (2021-11-02), XP55890607, DOI: 10.1101/2021.11.01.466790 Retrieved from the Internet: URL:https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.01.466790v1.full.pdf [retrieved on 2022-02-11] figure 3	1-91
T	ANZALONE ANDREW V. ET AL: "Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing", NATURE BIOTECHNOLOGY, 9 December 2021 (2021-12-09), XP55890609, New York ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/s41587-021-01133-w Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/s41587-021-01133-w.pdf> figure 3	1-91

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/056006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2021/138469 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]) 8 July 2021 (2021-07-08) paragraphs [0008] - [0016], [0042], [0043], [0052] - [0057], [0095], [0096]; claims 1-43 -----	1-91

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/056006

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/056006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020191234 A1	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020
WO 2020191245 A1	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/056006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015071898 A1	12-03-2015	AU 2014315070 A1	17-03-2016
		AU 2019201488 A1	28-03-2019
		AU 2021201257 A1	18-03-2021
		CA 2923418 A1	12-03-2015
		EP 3041497 A2	13-07-2016
		EP 3842063 A1	30-06-2021
		JP 2016537008 A	01-12-2016
		KR 20160050069 A	10-05-2016
		KR 20210059034 A	24-05-2021
		US 2015071898 A1	12-03-2015
		US 2015071899 A1	12-03-2015
		US 2016215276 A1	28-07-2016
		US 2021214698 A1	15-07-2021
		WO 2015035162 A2	12-03-2015
WO 2020191233 A1	24-09-2020	AU 2020240109 A1	30-09-2021
		AU 2020242032 A1	07-10-2021
		CA 3129988 A1	24-09-2020
		CA 3130488 A1	24-09-2020
		CN 113891936 A	04-01-2022
		CN 113891937 A	04-01-2022
		DE 112020001306 T5	27-01-2022
		DE 112020001339 T5	13-01-2022
		DE 112020001342 T5	13-01-2022
		EP 3942041 A1	26-01-2022
		EP 3942042 A1	26-01-2022
		EP 3942043 A2	26-01-2022
		KR 20210142210 A	24-11-2021
		KR 20210143230 A	26-11-2021
		SG 11202109679V A	28-10-2021
		SG 11202109882V A	28-10-2021
		WO 2020191153 A2	24-09-2020
		WO 2020191171 A1	24-09-2020
		WO 2020191233 A1	24-09-2020
		WO 2020191234 A1	24-09-2020
		WO 2020191239 A1	24-09-2020
		WO 2020191241 A1	24-09-2020
		WO 2020191242 A1	24-09-2020
		WO 2020191243 A1	24-09-2020
		WO 2020191245 A1	24-09-2020
		WO 2020191246 A1	24-09-2020
		WO 2020191248 A1	24-09-2020
		WO 2020191249 A1	24-09-2020
US 2014349400 A1	27-11-2014	US 2014349400 A1	27-11-2014
		US 2018298391 A1	18-10-2018
WO 2021138469 A1	08-07-2021	NONE	

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	***5/04 (2006.01)***	C12N	5/04		
C12N	***1/21 (2006.01)***	C12N	1/21		
C12N	***15/113 (2010.01)***	C12N	15/113	Z	
C12N	*15/12 (2006.01)*	C12N	15/12	ZNA	
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13		
C12N	*15/54 (2006.01)*	C12N	15/54		
C12N	*15/55 (2006.01)*	C12N	15/55		
C12N	*15/19 (2006.01)*	C12N	15/19		

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

リート・３００、アパートメント・５１０

Fターム（参考）　4B065　AA93X AB01 AC20 BA02 CA24 CA29 CA31