

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-515030

(P2025-515030A)

(43)公表日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全149頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-564665(P2024-564665)	(71)出願人	524399651
(86)(22)出願日	令和5年5月2日(2023.5.2)		フォндаジオン テレソン イーティーエス
(85)翻訳文提出日	令和6年12月26日(2024.12.26)		イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/061582		ヴァレーゼ 1 6 ピー
(87)国際公開番号	WO2023/213831	(74)代理人	110001416
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)		弁理士法人信栄事務所
(31)優先権主張番号	22171218.5	(72)発明者	アウリッキオ, アルベルト
(32)優先日	令和4年5月2日(2022.5.2)		イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ヴァレーゼ 1 6 ピー, フォндаジオン
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)	(72)発明者	デラクィラ, ファビオ
	最終頁に続く		イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア
		(72)発明者	エスポージト, フェデリカ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子編集用の相同性非依存性標的組込み

(57)【要約】

本発明は、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込む方法に関し、該方法は、前記外来DNA配列と任意に1つ以上のアルブミンエキソンを含むドナー核酸(該ドナー核酸は5'と3'で逆位標的配列に挟まれている)、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、および前記標的配列を認識するヌクレアーゼを細胞に接触させることを含み、ここで、前記標的配列は前記アルブミン遺伝子のイントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する。本発明はまた、前記ドナー核酸および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼを含むシステム、ベクターおよび医薬組成物、ならびにそれらの医学的使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外来 DNA 配列を細胞のゲノムに組み込む方法であって、前記細胞を以下のものと接触させることを含む方法：

a) 以下を含むドナー核酸：

- 前記外来 DNA 配列；
- 任意に 1 つ以上のアルブミンエキソン；

(ここで、前記ドナー核酸は 5' と 3' で逆位標的配列に挟まれている)、

b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド；および

c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ

(ここで、前記標的配列は前記アルブミン遺伝子のイントロン 9、イントロン 11、イントロン 12、イントロン 13 およびイントロン 14 から選択される領域のアルブミン遺伝子の 3' 末端に位置する)。

10

【請求項 2】

前記ドナー核酸が 1 つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンがエキソン 13 および / またはエキソン 14 またはそれらの断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ドナー核酸が 1 つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンがエキソン 10 および / またはエキソン 11 および / またはエキソン 12 および / またはエキソン 13 および / またはエキソン 14 またはそれらの断片である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドが、アルブミン遺伝子のイントロン 9、イントロン 11、イントロン 12、イントロン 13 またはイントロン 14 内に位置する標的配列、またはその相補鎖にハイブリダイズするガイド RNA であり、好ましくは、前記ガイド RNA はプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に隣接している、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記アルブミン遺伝子がヒトまたはマウスの遺伝子である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドがプロモーターの制御下にあり、好ましくは U6 プロモーターの制御下にある、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記外来 DNA 配列がアリルスルファターゼ B (ARSB) 遺伝子のコード配列であり、好ましくは前記 ARSB コード配列が、配列番号 33 と少なくとも 95% の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記外来 DNA 配列が、第 VIII 因子 (F8) 遺伝子のコード配列であり、好ましくは前記 F8 コード配列が、配列番号 36 または 55 と少なくとも 95% の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記逆位標的配列が、イントロン 9、イントロン 11、イントロン 12、イントロン 13 およびイントロン 14 から選択される領域におけるアルブミン遺伝子の 3' 末端に位置する標的配列に対して逆位の配列であり、好ましくは前記逆位標的配列がその 3' 末端でプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に連結されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ドナー核酸が更に以下の 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法：

- 転写後調節エレメント (好ましくは外来 DNA 配列の 3' 末端に局在する)；

50

- 転写終結配列（好ましくは転写後調節エレメントの3'末端または外来DNA配列の3'末端に局在する）；
- スプライサクセプター配列（好ましくはドナー核酸の3'末端に局在し、例えば、存在する場合は、アルブミンエキソンに連結されている）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくは外来DNA配列とアルブミンエキソンとの間に局在する）。

【請求項11】

前記リボソームスキッピング配列がT2A、P2A、E2A、F2Aであり、好ましくはT2A配列である、および/または前記転写後調節エレメントがウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)である、および/または前記転写終結配列がポリアデニル化シグナル配列であり、好ましくはウシ成長ホルモンポリA(BGHポリA)である、請求項10に記載の方法。

10

【請求項12】

前記標的配列が、配列番号1~2、配列番号9~18のいずれか1つまたはそれらの機能的断片と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有し、および/または前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドが、配列番号1~2、配列番号9~18のいずれか1つまたはそれらの機能的断片と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する、請求項1~10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記ドナー核酸が以下を含む、請求項1~12のいずれか一項に記載の方法：

20

- そのプロトSpacer隣接モチーフ(PAM)配列を有する第一の逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列；
- 好ましくはエキソン13および14から選択される1つ以上のアルブミンエキソン；
- 好ましくはT2Aであるリボソームスキッピング配列；
- 好ましくはヒトARSB遺伝子のコード配列である外来DNA配列；
- 転写終結配列；および
- そのプロトSpacer隣接モチーフ(PAM)配列を有する第二の逆位標的配列。

【請求項14】

前記ヌクレアーゼが、好ましくはCRISPRヌクレアーゼ、TALEN、DNA誘導ヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼおよび亜鉛フィンガーヌクレアーゼからなる群より選択され、好ましくは前記ヌクレアーゼが、Cas9、Cpf1、Cas12b(C2c1)、Cas13a(C2c2)、Cas3、Csf1、Cas13b(C2c6)およびC2c3、またはSaCas9もしくはVQR-Cas9-HF1などのそれらの変異型からなる群より選択されるCRISPRヌクレアーゼである、請求項1~13のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項15】

細胞が前記ヌクレアーゼをコードする核酸と接触させられ、好ましくは前記ヌクレアーゼをコードする核酸が、組織特異的プロモーター、例えば肝臓特異的ハイブリッド肝臓プロモーター(HLP)の制御下にある、請求項1~14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

40

前記相補鎖オリゴヌクレオチド、前記ドナー核酸およびヌクレアーゼをコードする核酸が、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクター中に含まれ、好ましくは前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスおよびアデノウイルスから選択される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記細胞が、肝細胞、1つ以上のリンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、心筋細胞、神経細胞、網膜細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、精母細胞、卵母細胞および膵臓細胞、人工多能性幹細胞(iPS細胞)、幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞からなる群より選択され、好ましくは細胞が被験体の肝細胞である、請求項1~16のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 の方法により得ることができる細胞であって、
 変異対立遺伝子と野生型対立遺伝子の両方がドナー DNA によって提供される正しい遺伝子のコピーで置換される疾患、または機能喪失による劣性遺伝性疾患および一般的な疾患、好ましくは血友病、糖尿病、ムコ多糖症などのリソソーム蓄積症、例えば MPS I、MPS II、MPS III A、MPS III B、MPS III C、MPS IV A、MPS IV B、MPS VI および MPS VII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病および GM1 ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバッテン病、およびムコリポドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病 A および B、ALA 脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーから選択される疾患の治療に使用するための細胞。 10

【請求項 19】

以下を含むシステム：

a) 以下を含むドナー核酸：

- 外来 DNA 配列；
 - 任意に、1つ以上のアルブミンエキソン；
- (ここで、前記ドナー核酸は 5' と 3' で逆位標的配列に挟まれている)；

b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド；および

c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ；

(ここで、前記標的配列はイントロン 9、イントロン 11、イントロン 12、イントロン 13 およびイントロン 14 から選択される領域のアルブミン遺伝子の 3' 末端に位置する)。 20

【請求項 20】

前記ヌクレアーゼが核酸によってコードされ、前記ドナー核酸、前記相補鎖オリゴヌクレオチドおよび前記ヌクレアーゼをコードする核酸が、DNA 構築物上に位置し、好ましくは前記ドナー核酸および前記相補鎖オリゴヌクレオチドが同じ DNA 構築物上に位置する一方、前記ヌクレアーゼをコードする核酸が別の DNA 構築物上に位置する、請求項 19 に記載のシステム。

【請求項 21】

ドナー核酸および/または外来 DNA 配列および/または標的配列および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼが、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に定義されているとおりである、請求項 19 ~ 20 のいずれか一項に記載のシステム。 30

【請求項 22】

相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはドナー核酸および/またはヌクレアーゼをコードする核酸が、1つ以上のウイルスベクターまたは非ウイルスベクター中に含まれ、好ましくは前記ウイルスベクターが、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびレンチウイルスから選択される、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 23】

ヌクレアーゼを発現する核酸を含む第一のベクターと、ドナー核酸および標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含む第二のベクターとを含み、これらのエレメントは請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に定義されたとおりである、請求項 22 に記載のシステム。 40

【請求項 24】

ドナー核酸を含む第一のベクターと、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に定義された標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよびヌクレアーゼをコードする核酸を含む第二のベクターとを含み、これらのエレメントは請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に定義されたとおりである、請求項 22 に記載のシステム。

【請求項 25】

医薬としての使用のための、請求項 19 ~ 24 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に定義されたドナー核酸および / または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび / または前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクター。

【請求項 27】

前記ベクターがウイルスベクターであり、好ましくはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターである、または非ウイルスベクターであり、好ましくはカチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子 (LNP) を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せから選択される、請求項 26 に記載のベクター。

【請求項 28】

5' 末端反復 (5' - TR) ヌクレオチド配列および 3' 末端反復 (3' - TR) ヌクレオチド配列を更に含み、好ましくは 5' - TR が 5' 逆位末端反復 (5' - ITR) ヌクレオチド配列であり、3' - TR が 3' 逆位末端反復 (3' - ITR) ヌクレオチド配列であり、好ましくは ITR が同じウイルス血清型または異なるウイルス血清型に由来し、好ましくはウイルスが AAV であり、好ましくは血清型 2 である、請求項 26 または 27 に記載のベクター。

10

【請求項 29】

請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載のシステム、または請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 30】

請求項 19 ~ 25 のいずれかに記載のシステム、または請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス粒子。

20

【請求項 31】

前記ウイルス粒子が AAV のカプシドタンパク質を含む、請求項 30 に記載のウイルス粒子。

【請求項 32】

前記ウイルス粒子が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9 および AAV10 からなる群の 1 つ以上より選択される血清型の AAV のカプシドタンパク質を含み、好ましくは AAV2 または AAV8 血清型の AAV のカプシドタンパク質を含む、請求項 31 に記載のウイルス粒子。

30

【請求項 33】

以下のいずれかを 1 つを含む医薬組成物：

請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載のシステム；または請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のベクター；請求項 29 に記載の宿主細胞；請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載のウイルス粒子；および薬学的に許容される担体。

【請求項 34】

請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載のシステム；または請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載の 1 つ以上のベクター；請求項 29 に記載の宿主細胞；請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載のウイルス粒子；または請求項 33 に記載の医薬組成物を 1 つ以上の容器中に含み、任意で核酸構築物、ベクター、宿主細胞、ウイルス粒子または医薬組成物を患者に投与する方法を記載した指示書またはパッケージング材料を更に含む、キット。

40

【請求項 35】

医薬としての使用のための、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項に記載のシステム；または請求項 26 ~ 28 のいずれか一項に記載のベクター；請求項 29 に記載の宿主細胞；請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載のウイルス粒子、または請求項 33 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

肝臓疾患、ムコ多糖症、例えば MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI および MPS VII などのリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピ

50

ック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバッテン病、およびムコリピドーシス；肝臓を治療用タンパク質の産生および/または分泌の工場として使用することができる他の疾患、例えば糖尿病、脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーの治療における使用のための、請求項29～25のいずれか一項に記載のシステム、請求項26～28のいずれか一項に記載のベクター、請求項29に記載の宿主細胞、請求項30～32のいずれか一項かに記載のウイルス粒子、または請求項33に記載の医薬組成物。

【請求項37】

ウイルス粒子の産生のための、請求項19～25のいずれか一項に記載のシステム、または請求項26～28のいずれか一項に記載のベクターの使用。

10

【請求項38】

請求項1～16のいずれか一項に定義された、ドナー核酸および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/または前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含むDNA構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的配列を認識するヌクレアーゼおよび標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドとともに、ドナー核酸を細胞に接触させることにより、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込む方法に関する。本発明はまた、前記ドナー核酸および/または前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼを含む構成物、ベクター、システムおよび医薬組成物、ならびにそれらの医学的使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

近年、ゲノム編集は遺伝性疾患の治療の現実的な選択肢として浮上している。ゲノム編集はエンドヌクレアーゼ（通常、CRISPR/Cas9）を使用する[1、2]。CRISPR-Cas9はリボ核タンパク質であり、ガイドRNA（gRNA）と呼ばれる配列に結合し、それをを用いてWatson-Crick塩基相補性によって標的DNA配列を認識する。この標的DNA配列は、Cas9がDNAに結合して標的配列を切断できるようにするプロト Spacer-隣接モチーフ（PAM）配列に隣接していなければならない[3]。Cas9のRNAベースの標的化は、異なる遺伝子座を標的とするためのその設計を容易にし、Cas9と2つの異なるgRNAを同じ細胞に送達することによって2つの異なる配列を標的とすることさえ可能にする。Cas9がゲノム内の特定の位置を標的化した後、二本鎖切断（DSB）を生成し、これは2つの修復メカニズムのいずれかによって修復される：

30

【0003】

非相同末端結合（NHEJ）は、ほとんどの細胞型で最も優勢な構造であり、それは細胞周期のすべての段階で活発であり、修復のためのDSB部位での塩基のランダムな挿入または欠失から構成される。このランダムな挿入または欠失（INDEL）は、しばしば読み枠の変化を引き起こし、標的遺伝子の発現をロックアウトする[3]。

40

【0004】

相同性指向性修復（HDR）は主に細胞周期のGおよびS2期に起こるプロセスであり、外部ドナーDNAまたはもう一つの対立遺伝子によって提供され得る相同鋳型を使用して、DSBを正確に修正する[3]。HDRによる遺伝子修復は、in vitro[4]およびin vivo[5-8]で、Cas9非存在下でも[6]、成功裏に使用されてきた。しかしながら、その効率は、分化細胞における相同組換え経路の低活性によってin vivoで制限される[9]。したがって、当該分野では、活発な再生を受けていない組織および分化細胞における遺伝子修復を可能にする代替の治療用遺伝子置換戦略が求められている。

【0005】

50

相同性非依存性標的組込み (HIT I) は、最近、HDRによる遺伝子修復および対立遺伝子特異的ノックアウトの両方の限界を克服するために開発された [1 0、1 1]。HIT I は、目的の遺伝子内の同じ gRNA 標的配列に挟まれたドナー DNA を使用する。Cas 9 が遺伝子とドナー DNA の両方を切断した後に、細胞の NHEJ 構造は、IND EL を伴わずに驚くほど高い組込み率 (60 ~ 80%) で、ドナー DNA を切断の修復に含めることができる。ドナー DNA が逆向きに組み込まれる可能性は、その gRNA 標的配列を反転させることによって回避され、逆向きの組込みが起こった場合、Cas 9 は標的配列を再び認識して切断することができる。HIT I は NHEJ を使用するため、ニューロンのような最終分化細胞または肝臓のような組織 (例えば成人組織および小児組織の両方) において、その再生ポテンシャルとは無関係に有効である [1 1]。さらに、治療遺伝子の野生型コピーの HIT I 媒介挿入は、特定の疾患の原因となる変異および標的細胞の潜在的な増殖状態とは無関係に、治療効果をもたらす可能性を有する [1 1]。

10

【 0 0 0 6 】

本発明者らは以前に、肝臓を高レベルの治療用タンパク質を全身に放出するための工場に変換するために HIT I を使用できることを見出した。それは、血友病、LSD、糖尿病のように、機能喪失や状態によって引き起こされる多くの遺伝性および一般的な症状の治療 (置換されるべき因子が、肝臓から分泌される、および / または血液を通じて他の標的臓器に到達してその機能を果たす必要がある) に望ましく、効率の低い酵素補充療法、従来の遺伝子治療および遺伝子編集といった現在利用可能な治療法の限界を克服する。

【 0 0 0 7 】

アデノ随伴ウイルス (AAV) に基づくベクターは、それらの安全性プロファイル、広い向性および長期にわたる導入遺伝子の発現を提供する能力のために、遺伝子治療の *in vivo* 適用に最も頻繁に使用される [1 2]。しかしながら、AAV ゲノムのエピゾーム状態を考えると、発育中の肝臓においては、または肝臓に損傷がある場合は、AAV からの肝臓の導入遺伝子の発現は時間とともに失われる可能性があり [1 3]、例えば小児患者においては限定的な成功である。

20

【 0 0 0 8 】

したがって、より安定で効率的な肝臓の導入遺伝子の発現が必要とされている。本発明者らによって開発された HIT I は、高転写アルブミン遺伝子座に目的の分泌タンパク質のコード配列を挿入し [5 - 8]、アルブミンタンパク質の内因性発現を維持しながら全身に分泌される高レベルのタンパク質の長期の発現を提供することによって、前記限界を克服する。

30

【 0 0 0 9 】

ムコ多糖症 VI 型 (MPS VI) は、アリルスルファターゼ B (ARSB) 欠損症によって引き起こされる稀なリソソーム蓄積症 (LSD) であり、その結果、毒性グリコサミノグリカン (GAG) の広範な蓄積および尿中排泄をもたらす。臨床的には、MPS VI 表現型は、成長遅延、顔貌粗造、骨格変形、関節硬直、角膜混濁、心臓弁肥厚、および臓器肥大によって特徴付けられ、一次性認知障害は存在しない [1 4]。MPS の治療は、正常なリソソーム加水分解酵素が分泌され、次いでマンノース - 6 - リン酸受容体経路を介してほとんどの細胞によって取り込まれることに依存している。

40

【 0 0 1 0 】

本発明者らは以前に、ARSB をコードする組換え AAV ベクター血清型 8 (AAV 2 / 8) の単回全身投与が、肝臓特異的チロキシン結合グロブリン (TBG) プロモーター (AAV 2 / 8 . TBG . hARSB) の転写制御下で、MPS VI 動物モデルにおいて持続的な肝臓形質導入および表現型の改善をもたらすことを実証した [1 5 - 2 1]。本発明者らはまた、これが、この病態の現在の標準的治療である酵素補充療法 (ERT) の週 1 回の投与と少なくとも同等に、MPS VI マウスにおいて有効であることを示した [2 2 - 2 4]。本発明者らは最近、このアプローチの安全性と有効性の両方を MPS VI 患者で検証するためのフェーズ I / II 臨床試験 (Clinical Trials . gov 識別子 : NCT03173521) を開始した。

50

【 0 0 1 1 】

血友病 A (H e m A) は、凝固因子 V I I I または 8 (F V I I I または F 8) の活性の欠損または完全な欠如によって引き起こされる重篤な出血性疾患である。それは最も一般的な遺伝性 X 連鎖性劣性凝固障害であり、その発生率は世界中で男子の出生約 5 , 0 0 0 人に 1 人である。

【 0 0 1 2 】

H e m A の症例の約 5 0 % は重症であり、すなわち循環 F V I I I レベルが 1 % 未満である [2 5]。H e m A の重症型は、筋骨格と軟組織の自然出血ならびに凝固因子濃縮液を注入しない限り外傷後に止血を達成できないことによって臨床的に特徴付けられる。現在の治療法は、遺伝子組み換えまたは血漿由来の凝固 F V I I I の予防的投与である。注入は頻繁に (週に 2 回または 3 回) 必要であり、負担となり得る。さらに、それらは自然出血を防ぐことができず、中和抗 F V I I I 抗体 (インヒビター) が発生するリスクが常に高い (患者の約 2 5 ~ 3 0 %)。したがって、代替手段としての遺伝子治療は、一回の投与で生涯にわたる治療が得られる大きな期待がある。

【 0 0 1 3 】

H e m A の遺伝子治療の使用は、F V I I I レベルのわずかな改善 (1 ~ 2 %) によっても自然出血のリスクを大幅に減少させ、F V I I I 補充注入の必要性を減少させ得ることが観察されて以来、過去 2 0 年間にわたって広範に研究されてきた。さらに、遺伝子治療は、遺伝子発現を厳密に制御する必要がなく、容易に定量可能な治療エンドポイント (F V I I I 血漿レベル) を有する、広い治療範囲を有する。F V I I I 補充のためのいくつかの遺伝子導入戦略が評価されており、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターは、そのベクターの優れた安全性プロファイルおよび肝臓などの有糸分裂後組織からの長期にわたる導入遺伝子の発現を指示する能力のために、最も有望なものとして浮上している。しかしながら、導入される F 8 遺伝子コード配列のサイズ (7 k b) が A A V の標準的な運搬能力である 4 . 7 k b を超えるため、H e m A は A A V 遺伝子治療に大きな課題をもたらす。以前、B - ドメイン欠失 (B D D) F 8 および短い肝臓特異的プロモーターとポリ A シグナルの両方を含む 5 k b 発現カセットが A A V 5 にパッケージ化され、マウスおよびカニクイザルだけでなく、H e m A 患者においても治療レベルの F V I I I をもたらすことが示された [2 6] [2 7]。しかしながら、このベクターのゲノムはわずかにオーバーサイズであり、不均一な切断ゲノムのライブラリとして A A V カプシドにパッケージ化されており、標的細胞内で再構成されると非効果的な形質導入となる。オーバーサイズ A A V ベクターの効率は正常サイズと比較して低く、不均一な切断ゲノムを有するそのような製品の品質はその更なる開発を妨げる可能性がある。臨床研究中の A A V ベースの全ての製品は、F 8 導入遺伝子の B - ドメイン欠失 (B D D) バージョンからなり、そのサイズは約 4 . 4 k b である [2 8]。それでもなお、そのような大きな導入遺伝子は、ベクター中の必要な調節エレメントのためのスペースを限定し、それによってプロモーターおよびポリ A シグナルの選択を制限する。さらに、これらのベクターゲノムの全ては、A A V の正常な運搬能力の限界にあり、不均一な切断ゲノムのライブラリとして不適切にパッケージ化されるリスクがある。大きなタンパク質を成功裏に発現するそのようなオーバーサイズベクターの能力にもかかわらず、それらの長期の効率および安全性はなお確認されるべきである [2 8 - 3 2]。

【 0 0 1 4 】

高転写アルブミン遺伝子座の肝細胞における H I T I は、A A V を用いた他の安全で効果的な肝臓遺伝子治療のいくつかの限界を克服する可能性があり、以下を含む：

- (i) 導入遺伝子の発現レベル (特にアルブミン遺伝子座からの発現が高い) ；
- (i i) 肝細胞が失われた場合、および発育中の肝臓において複製されるゲノム遺伝子座に治療用コード配列が挿入されることによって保証される導入遺伝子の発現の安定性 (小児患者への治療が可能となる) 。

【 0 0 1 5 】

H I T I に基づく外来 D N A 配列を細胞のゲノムに組み込むための従来のアプローチが

WO 2020079033に開示されており、特にアルブミン遺伝子の第2エキソンが標的とされている。そのアプローチでは、標的とされたアルブミン遺伝子座は、目的の導入遺伝子を有するドナーDNAの挿入によって破壊された。

治療用タンパク質の安定した全身発現を必要とする疾患のための遺伝子治療戦略に対するニーズはなお存在する。

【発明の概要】

【0016】

発明者らは、その発現を妨害することなくアルブミン遺伝子を標的とするHITIシステムを利用して、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込むための新しいアプローチを見出した。有効性の証拠は、MPS VIマウスでは、アリルスルファターゼB（ムコ多糖症VI（MPS VI）で欠損しているリソソーム酵素）をコードするARSBを用いて提供され、また血友病マウスでは、血友病Aで欠損している因子VIIをコードするF8 Codon V3導入遺伝子を用いて提供された。

10

【0017】

発明者らは、新規HITIシステムを介したマウスアルブミン（mAlb）の3'末端への導入遺伝子、例えばARSBまたはF8の組込みが、欠損酵素のレベルおよび/または活性の増加をもたらすことを見出した。特にARSBの組込みは、試験した2回用量は超生理学的レベルの酵素循環をもたらし、一方、1回用量はより低いレベルの酵素循環を誘導した。そして、MPS VIマウスでは新生児への投与の36週後まで表現型が改善し、一方、本発明のシステムで処理された血友病マウスのF8活性レベルは影響を受けていない対照群と比較して20%増加した。発明者らはまた、ヒトアルブミン（hALB）の3'末端へのレポーター遺伝子の*in vitro*での組込みを実証した。

20

【0018】

全体として、新規HITIは、肝細胞増殖を伴う肝臓からの治療用導入遺伝子の安定した高発現レベルをもたらす。

【0019】

本発明は、肝臓で高レベルに発現される遺伝子、すなわちアルブミンの遺伝子座内での目的の配列の挿入に依拠する。目的の遺伝子は、アルブミンプロモーターの下で発現し、肝実質内の比較的少数の細胞からではあるが、目的の遺伝子の高レベルの発現をもたらす。したがって、目的の遺伝子の発現は、治療効果を達成するのに十分高い。さらに、目的の遺伝子は肝臓ゲノムに安定に組み込まれるので、組織再生（小児においてまたは肝臓損傷時）に際して、目的の遺伝子の発現は失われない。アルブミン遺伝子座は、アルブミン遺伝子の発現の維持を可能にする戦略で標的とされる。

30

【0020】

本発明の目的は、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込む方法であり、細胞を以下のものと接触させることを含む：

a) 以下を含むドナー核酸：

- 前記外来DNA配列
- 任意に1つ以上のアルブミンエキソン；

（ここで、前記ドナー核酸は5'と3'で逆位標的配列によって挟まれている）、

b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、

c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ

（ここで、前記標的配列は前記アルブミン遺伝子のイントロン9、イントロン11、イントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する）。

40

本発明では、ドナー核酸は好ましくは1つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンはエキソン10および/またはエキソン11および/またはエキソン12および/またはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。

【0021】

本発明の目的は、外来DNA配列を細胞のゲノムに組み込む方法であり、細胞を以下の

50

ものと接触させることを含む：

a) 以下を含むドナー核酸：

- 前記外来DNA配列

- 任意に1つ以上のアルブミンエキソン；

(ここで、前記ドナー核酸は5'と3'で逆位標的配列によって挟まれている)、

b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、

c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ

(ここで、前記標的配列は前記アルブミン遺伝子のイントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する)。

本発明では、ドナー核酸は好ましくは1つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。 10

【0022】

好ましい実施形態では、前記アルブミンエキソンは存在し、それはエキソン10および/またはエキソン11および/またはエキソン12および/またはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。好ましくは、それは外来DNA配列の5'末端に位置し、リボソームスキッピング配列によってそこから分離することができる。

【0023】

好ましい実施形態では、前記アルブミンエキソンは存在し、それはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。好ましくは、それは外来DNA配列の5'末端に位置し、リボソームスキッピング配列によってそこから分離することができる。本発明では、ドナー核酸は好ましくは1つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンはエキソン10および/またはエキソン11および/またはエキソン12および/またはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。 20

【0024】

本発明では、ドナー核酸は好ましくは1つ以上のアルブミンエキソンを含み、前記エキソンはエキソン13および/またはエキソン14またはそれらの断片である。

【0025】

前記アルブミンエキソンは任意の起源のアルブミン遺伝子由来であり得るが、好ましくは、それらはヒトまたはマウスのアルブミン遺伝子に由来する。

【0026】

好ましくは、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、アルブミン遺伝子のイントロン9、イントロン11、イントロン12、イントロン13またはイントロン14内に位置する標的配列、またはその相補鎖にハイブリダイズするガイドRNAであり、好ましくは、前記ガイドRNAはプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接している。

【0027】

好ましくは、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、アルブミン遺伝子のイントロン12、イントロン13またはイントロン14内に位置する標的配列、またはその相補鎖にハイブリダイズするガイドRNAであり、好ましくは、前記ガイドRNAはプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接している。 40

【0028】

好ましくは、標的配列はガイドRNA(gRNA)標的部位であり、前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、イントロン12、イントロン13またはイントロン14内に位置する標的配列、またはその相補鎖にハイブリダイズするガイドRNAである。したがって、前記オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼをアルブミン遺伝子のイントロン12、13または14内で切断するように導く。好ましくは、前記ガイドRNAは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接している。

【0029】

好ましくは、標的配列はガイドRNA(gRNA)標的部位であり、前記標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、イントロン9、イントロン11、イントロン12、イ 50

ントロン13またはイントロン14内に位置する標的配列、またはその相補鎖にハイブリダイズするガイドRNAである。したがって、前記オリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼをアルブミン遺伝子のイントロン9、11、12、13または14内で切断するように導く。好ましくは、前記ガイドRNAは、プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)配列に隣接している。

【0030】

本発明の文脈において、アルブミン遺伝子は好ましくはヒトまたはマウスの遺伝子である。

【0031】

好ましくは、前記標的配列は配列番号1~2、9~18、54、92~98のいずれか1つ、またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有し、および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、配列番号1~2、9~18、54、92~98のいずれか1つ、またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

10

【0032】

この実施形態では、配列番号2、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号54、92~98のいずれか1つ、またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を含むか、または有するガイドRNAは、配列番号1、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17もしくは配列番号18、またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を含むか、または有する標的配列、またはその相補鎖に結合することができる。

20

【0033】

この実施形態では、配列番号2、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号17もしくは18またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を含むか、または有するガイドRNAは、配列番号1、配列番号9、配列番号11、配列番号13または配列番号15、配列番号16、配列番号17もしくは18またはそれらの断片と少なくとも95%の同一性を含むか、または有する標的配列、またはその相補鎖に結合することができる。

【0034】

好ましくは、前記断片は少なくとも15ヌクレオチド長である。

30

【0035】

一実施形態では、標的配列および各gRNAは、表1および3に記載されているとおりである。

【0036】

本発明はまた、上記で言及した配列、すなわち配列番号1、2、9~18、54、92~98が逆向きの配列、すなわち3'から5'への方向を有する実施形態を含む。

【0037】

本発明はまた、上記で言及した配列、すなわち配列番号1、2、9~18、54、92~98がRNAである実施形態を含む。

【0038】

前記gRNAもまた本発明の対象である。

40

【0039】

本発明の更なる対象は、配列番号1、配列番号2、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17または配列番号18、54、92~98から選択される配列、およびそれらの少なくとも15ヌクレオチド長の部分に実質的に相補的であるか、または完全にアニーリングする配列を含む、またはそれからなる単離されたガイドリボ核酸(gRNA)である。好ましくは、アルブミン遺伝子はヒトまたはマウス由来である。

【0040】

前記アルブミン遺伝子イントロンは任意の起源のアルブミン遺伝子中に存在し得るが、

50

好ましくは、それらはヒトまたはマウスのアルブミン遺伝子中に存在する。

【0041】

一実施形態では、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドはプロモーターの制御下にあり、好ましくはU6プロモーターの制御下にある。

【0042】

本発明では、ガイドRNAまたはgRNAは、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドの同義語として使用することができる。。

【0043】

好ましい実施形態では、前記外来DNA配列はアリルスルファターゼB (ARSB) 遺伝子のコード配列である。好ましくは、前記ARSBコード配列はヒト由来である。好ましくは、それは配列番号33と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。コード配列は、アリルスルファターゼB (ARSB) の変異型をコードすることができ、例えばそれは、これらのタンパク質変異型が元のARSBと実質的に同じ関連する機能的活性を保持する限り、野生型アリルスルファターゼB (ARSB) 遺伝子のコード配列に対する付加、欠失または置換を含み得る。コード配列はまた、その断片が元のARSBと実質的に同じ関連する機能的活性を保持する限り、アリルスルファターゼB (ARSB) の断片をコードすることができる。

10

【0044】

好適には、コード配列はヒトにおける発現に対してコドン最適化され得る。

【0045】

更に好ましい実施形態では、前記外来DNA配列は、第VIII因子 (F8) 遺伝子またはBドメイン欠失 (BDD) F8 遺伝子のコード配列である。好ましくは、前記BDD F8コード配列はヒト由来であり、より好ましくは、それは配列番号36または55と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。好ましくは、F8コード配列は配列番号36または55と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。コード配列は、BDD F8またはF8の変異型をコードすることができる。例えばそれは、これらのタンパク質変異型がそれぞれ元のBDD F8またはF8と実質的に同じ関連する機能的活性を保持する限り、野生型BDD F8遺伝子または野生型F8遺伝子のコード配列に対する付加、欠失または置換を含み得る。またコード配列は、その断片がそれぞれ元のBDD F8またはF8と実質的に同じ関連する機能的活性を保持する限り、BDD F8またはF8の断片をコードすることもできる。

20

30

【0046】

更に好ましい実施形態では、前記外来DNA配列は、劣性遺伝性疾患患者において機能喪失を引き起こす変異の対象となる遺伝子のコード配列である。したがって肝臓は治療的標的として使用することができる。。

【0047】

更に好ましい実施形態では、前記外来DNA配列は、1-アンチトリプシン (AAT) 欠損症、ウィルソン病、OAT欠損症、MPSVIIにおいて変異したF9遺伝子または遺伝子群のコード配列である。

【0048】

本発明の文脈における逆位標的配列は、切断されて標的遺伝子座に組み込まれるDNA構築物であるドナー核酸の上流に1つおよび下流に1つ位置する。逆位標的配列は、標的ゲノム遺伝子座においてガイドRNAが認識する配列、つまり標的配列と完全に同一であるが、ゲノム配列に対して逆位または逆向きである。逆位または逆向きとは、標的配列が特定の5' - 3'配列を有する場合、逆位標的配列は同じ配列を有するが3' - 5'の方向を有することを意味する。したがって、逆位標的配列はガイドRNAに相補的であるが逆位である。これにより、HITIの方法において既知であるように、一方向の組込みを得ることができる。要するに、ドナーDNAが反対方向に組み込まれた場合、Cas9などのヌクレアーゼは再びその標的部位を認識して切断することができる。正しい方向での組込みでは、ヌクレアーゼはもはや標的部位を切断することができない。前記逆位標的配列は

40

50

、好ましくはイントロン 9、イントロン 11、イントロン 12、イントロン 13 およびイントロン 14 から選択される領域におけるアルブミン遺伝子の 3' 末端に位置する標的配列に対して逆位の配列である。好ましくは、前記逆位標的配列の各々はその 3' 末端でプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列に連結される。

【0049】

前記外来 DNA 配列はまた、レポーター遺伝子を含み得、好ましくは、前記レポーター遺伝子は Discosoma Red、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、ルシフェラーゼ、
- ガラクトシダーゼ、および
- グルクロニダーゼの少なくとも 1 つから選択される。

【0050】

一実施形態では、前記ドナー核酸は更に以下の 1 つ以上を含む：

- 転写後調節エレメント (好ましくは外来 DNA 配列の 3' 末端に局在する)；
- 転写終結配列 (好ましくは転写後調節エレメントの 3' 末端または外来 DNA 配列の 3' 末端に局在する)；
- スプライスアクセプター配列 (好ましくはドナー核酸の 3' 末端に局在し、例えば、存在する場合は、アルブミンエキソンに連結されている)；
- リボソームスキッピング配列 (好ましくは外来 DNA 配列とアルブミンエキソンとの間に局在する)。

【0051】

一実施形態では、前記ドナー核酸は更に以下の 1 つ以上を含む：

- スプライスアクセプター配列 (好ましくはドナー核酸の 5' 末端に局在し、例えば、存在する場合は、アルブミンエキソンに連結されている)；
- リボソームスキッピング配列 (好ましくはアルブミンエキソンと外来 DNA 配列との間に局在する)；
- 転写後調節エレメント (好ましくは外来 DNA 配列の 3' 末端に局在する)；
- 転写終結配列 (好ましくは転写後調節エレメントの 3' 末端または外来 DNA 配列の 3' 末端に局在する)。

【0052】

好ましくは、リボソームスキッピング配列は T2A、P2A、E2A、F2A であり、好ましくは T2A 配列である。この配列は、細胞内で発現されたとき、目的のタンパク質をアルブミンから分離することを可能にする。

【0053】

好ましくは、前記転写後調節エレメントは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) である。

【0054】

好ましくは、前記転写終結配列はポリアデニル化シグナル配列であり、好ましくはウシ成長ホルモンポリ A (BGH ポリ A) であり、最も好ましくは短い合成ポリ A である。上記のように、ドナー DNA 配列は、gRNA が認識するが逆位である同じ gRNA 標的部 (例えば、逆位標的部) によって、5' と 3' で挟まれる。

【0055】

好ましくは、標的配列は本明細書中で言及した配列の 1 つと少なくとも 95% の同一性を有する配列またはそれらの機能的断片を含むか、または本質的に有し、および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドは、本明細書中で言及した配列の 1 つと少なくとも 95% の同一性を有する配列またはそれらの機能的断片を含むか、または本質的に有する。

【0056】

好ましくは、逆位標的配列は、配列番号 20、54 もしくは 77、または配列番号 2 もしくは 1、または配列番号 9 ~ 18、92 ~ 98 もしくは 54 のいずれか 1 つと少なくとも 95% の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0057】

10

20

30

40

50

好ましくは、前記ドナー核酸は以下を含む：

- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を有する逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列；
- 1つ以上のアルブミンエキソン（好ましくはエキソン13および14から選択される1つ以上のエキソン）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくはT2A）；
- 外来DNA配列（好ましくはマーカーdsRed、ヒトARSB遺伝子またはBDDF8遺伝子のコード配列）；
- 転写終結配列；および
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を有する更なる逆位標的配列。

【0058】

好ましくは、前記ドナー核酸は以下を含む：

- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を有する逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列；
- 1つ以上のアルブミンエキソン（好ましくはエキソン10、エキソン11、エキソン12、エキソン13およびエキソン14から選択される1つ以上のエキソン）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくはT2A）；
- 外来DNA配列（好ましくはマーカーdsRed、ヒトARSB遺伝子またはBDDF8遺伝子のコード配列）；
- 転写終結配列；および
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を有する更なる逆位標的配列。

【0059】

好ましくは、列挙したように前記エレメントは5' - 3'の順序であるが、他の順序も同様に好適であり得る。

【0060】

好ましくは、前記転写終結配列は、配列番号26、配列番号37、配列番号48または配列番号65と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0061】

好ましくは、前記リボソームスキッピング配列は、配列番号23または63と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0062】

好ましくは、前記アルブミンエキソンは、配列番号22および/または78および/または79と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0063】

好ましくは、前記スプライサクセプター配列は、配列番号21と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に本質的に有する。

【0064】

好ましくは、前記逆位標的配列は、配列番号1または2または20または54または77と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に本質的に有し、好ましくはPAM配列を含まない。

【0065】

前記ヌクレアーゼは、タンパク質としてまたは前記ヌクレアーゼをコードする核酸として提供することができる。前記核酸はDNAまたはRNAであり得、例えばそれはヌクレアーゼのmRNAであり得、またはそれはヌクレアーゼのcDNAもしくはDNAコード配列、またはヌクレアーゼをコードするDNA構築物であり得る。

【0066】

好ましくは、前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、Cas9またはspCas9をコードする核酸を含むDNA構築物であり、好ましくは組織特異的プロモーター、例えば、肝臓ハイブリッド肝臓プロモーター（HLP）のような肝臓特異的プロモーターの制御下

にある。前記構築物は更にポリA、好都合には短い合成ポリA (s y n t . ポリA) を含み得る。そのような全てのエレメントは当該技術分野において周知であり、従来のヌクレオチド配列を有し得る。ヌクレアーゼをコードする例示的DNA構築物は、配列番号43、47または52と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0067】

前記ヌクレアーゼは好ましくは、CRISPRヌクレアーゼ、TALEN、DNA誘導ヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼおよび亜鉛フィンガーヌクレアーゼからなる群より選択され、好ましくは、前記ヌクレアーゼはCas9、Cpf1、Cas12b (C 2 c 1)、Cas13a (C 2 c 2)、Cas3、Csf1、Cas13b (C 2 c 6) およびC 2 c 3、またはSaCas9、VQR-Cas9-HF1もしくはdcas9などのそれらの変異型からなる群より選択されるCRISPRヌクレアーゼである。

10

【0068】

好ましくは、細胞は前記ヌクレアーゼをコードする核酸と接触させられ、好ましくは前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、組織特異的プロモーター、例えば肝臓特異的ハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) の制御下にある。

【0069】

好ましくは、前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、組織特異的プロモーター、最も好ましくは肝臓特異的プロモーター、例えば肝細胞特異的プロモーター、例えば肝臓特異的ハイブリッド肝臓プロモーター (H L P) の制御下にある。

20

【0070】

好適には、前記ドナー核酸、標的配列に相同な前記相補鎖オリゴヌクレオチドおよび前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、DNA構築物中に含まれる。好ましくは、第一のDNA構築物はドナー核酸および標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含み、第二のDNA構築物は前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。あるいは、第一のDNA構築物はドナー核酸を含み、第二のDNA構築物は標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。更なる選択肢として、3つの構築物が提供される。第一の構築物はドナー核酸を含み、第二の構築物は標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含み、第三の構築物は前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。

30

【0071】

前記構築物もまた本発明の対象である。

【0072】

好ましくは、1つ以上の前記DNA構築物はベクター中に含まれ、好ましくはウイルスベクター中に含まれ、さらに好ましくはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター中に含まれる。あるいは、全てまたは一部の前記DNA構築物は非ウイルスベクター中に挿入されることもあり、前記非ウイルスベクターは、カチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子 (L N P) を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せから選択される。

40

【0073】

前記ベクターもまた本発明の対象である。

【0074】

前記相補鎖オリゴヌクレオチド、前記ドナー核酸および前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、1つ以上のウイルスベクターまたは非ウイルスベクター中に含まれ得、好ましくは、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスおよびアデノウイルスから選択される。これは、それらが同じベクター中または異なるベクター中にあり得ることを意味する。好ましくは、細胞は、肝細胞、1つ以上のリンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、内皮細胞、上皮細胞、肝細胞、骨細胞、血小板、脂肪細胞、心筋細胞、神経細胞、網膜細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、精母細胞、卵母細胞およ

50

び臍臓細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、幹細胞、造血幹細胞、造血前駆細胞からなる群より選択され、好ましくは、細胞は被験体の肝細胞である。本発明の別の対象は、上記で定義した方法によって得ることができる細胞である。

【0075】

前記細胞は、医薬として、または遺伝性疾患の治療に、または劣性遺伝性疾患および一般的な疾患（好ましくは、前記疾患は、糖尿病、ムコ多糖症（MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI、MPS VII）を含むリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症（ファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、GM1ガングリオシドーシス）、リポフスチン症（バッテン病および他のもの）およびムコリポドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーを含む）の治療に使用することができる。

10

【0076】

本発明の細胞は、野生型対立遺伝子と変異対立遺伝子の両方がドナーDNAによって提供される正しい遺伝子のコピーで置換される疾患、または機能喪失による劣性遺伝性疾患および一般的な疾患（好ましくは、前記疾患は、血友病、糖尿病、ムコ多糖症を含むリソソーム蓄積症、例えばMPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VIおよびMPS VII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバッテン病、およびムコリポドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーを含む）の治療に使用することができる。

20

【0077】

したがって本発明の細胞は、血友病、糖尿病、ムコ多糖症などのリソソーム蓄積症、例えばMPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VIおよびMPS VII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバッテン病、およびムコリポドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症または副腎白質ジストロフィーの治療に使用することができる。

30

【0078】

本発明によって得ることができる細胞は、外来DNA配列を発現する。好適には、本発明によって得ることができる細胞は、全長アルブミンコード配列も発現する。

【0079】

ドナー核酸が細胞と接触すると、それは通常、非相同末端結合を介して標的遺伝子に挿入される。

【0080】

本発明の更なる対象は、以下を含むシステムである：

a) 以下を含むドナー核酸：

- 外来DNA配列；
- 任意に、1つ以上のアルブミンエキソン；

40

（ここで、前記ドナー核酸は5'と3'で逆位標的配列によって挟まれている）、

b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、および

c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ

（ここで、前記標的配列はイントロン9、イントロン11、イントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する）。

【0081】

本発明の更なる対象は、以下を含むシステムである。

a) 以下を含むドナー核酸：

50

- 外来DNA配列；
 - 任意に、1つ以上のアルブミンエキソン；
- (ここで、前記ドナー核酸は5'と3'で逆位標的配列によって挟まれている)、
- b) 標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、および
 - c) 前記標的配列を認識するヌクレアーゼ
- (ここで、前記標的配列はイントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する)。

【0082】

前記ヌクレアーゼは、タンパク質としてまたは前記ヌクレアーゼをコードする核酸として提供することができる。前記核酸はDNAまたはRNAであり得、例えばそれはヌクレアーゼのmRNAであり得、またはそれはヌクレアーゼのcDNAもしくはDNAコード配列、またはヌクレアーゼをコードするDNA構築物であり得る。

【0083】

一実施形態では、前記ヌクレアーゼは核酸によってコードされ、前記ドナー核酸、前記相補鎖オリゴヌクレオチドおよび前記ヌクレアーゼをコードする核酸は、DNA構築物上に位置し、好ましくは前記ドナー核酸および前記相補鎖オリゴヌクレオチドは同じDNA構築物上に位置する一方、前記ヌクレアーゼをコードする核酸は別のDNA構築物上に位置する。好ましくは、前記ドナー核酸および前記相補鎖オリゴヌクレオチドを含む前記構築物は、以下の配列：配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号33、配列番号26、配列番号20、配列番号27、配列番号1および配列番号28を含む配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0084】

別の実施形態では、前記ドナー核酸を含む構築物は、以下の配列：配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号36、配列番号37、配列番号20を含む配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0085】

前記ドナー核酸および前記相補鎖オリゴヌクレオチドを含む構築物は、配列番号34と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有し得る。

【0086】

前記ドナー核酸を含む構築物は、配列番号38と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有し得る。

【0087】

好ましい実施形態では、ドナー核酸および/または外来DNA配列および/またはアルブミンエキソンおよび/または逆位標的配列および/または標的配列および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼおよび/またはイントロンは、上記で定義したとおりまたは本明細書中に定義したとおりである。

【0088】

本発明の別の対象は、そのようなDNA構築物を宿主細胞中に導入することを含む、ウイルスベクターの粒子を調製するプロセスである。更に、ウイルスベクターの粒子を得ることもまた本発明の対象である。

【0089】

好ましい実施形態では、ドナー核酸および/または外来DNA配列および/または標的配列および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼは、上記で定義したとおりである。

【0090】

好ましい実施形態では、ドナー核酸および/または外来DNA配列および/またはアルブミンエキソンおよび/または逆位標的配列および/または標的配列および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼおよび/またはイントロンは、上記または本明細書中に定義したとおりである。

【0091】

10

20

30

40

50

本発明の文脈において、ドナー核酸および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼをコードする核酸は、1つ以上のウイルスベクターまたは非ウイルスベクター中に含まれ、好ましくは、前記ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびレンチウイルスから選択され；前記非ウイルスベクターは好ましくは、カチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子(LNP)を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せから選択される。

【0092】

好ましくは、第一のベクターはドナー核酸および標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含み、第二のベクターは前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。あるいは、第一のベクターはドナー核酸を含み、第二のベクターは標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。更なる選択肢として、3つのベクターが提供される。第一のベクターはドナー核酸を含み、第二のベクターは標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含み、第三のベクターは前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含む。

10

【0093】

好ましくは、このシステムはヌクレアーゼを発現する核酸を含む第一のベクターと、ドナー核酸および標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドを含む第二のベクターとを含み、これらのエレメントは上記または本明細書中で定義されたとおりである。

【0094】

好ましくは、このシステムは、ドナー核酸を含む第一のベクターと、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよびヌクレアーゼをコードする核酸を含む第二のベクターとを含み、これらのエレメントは上記または本明細書中で定義されたとおりである。本発明によるシステムは、好ましくは医療用であり、好ましくは遺伝性疾患の治療における使用または機能喪失による遺伝性疾患および一般的な疾患(好ましくは、前記疾患は、糖尿病、ムコ多糖症(MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI、MPS VII)を含むリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症(ファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、GM1ガングリオシドーシス)、リポフスチン症(パッテン病および他のもの)およびムコリピドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーを含む)の治療における使用のためのものである。

20

30

【0095】

本発明のシステムは、野生型対立遺伝子と変異対立遺伝子の両方がドナーDNAによって提供される正しい遺伝子のコピーで置換される疾患、または機能喪失による劣性遺伝性疾患および一般的な疾患(好ましくは、前記疾患は、血友病、糖尿病、ムコ多糖症を含むリソソーム蓄積症、例えばMPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VIおよびMPS VII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばパッテン病、およびムコリピドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーを含む)の治療に使用することができる。

40

【0096】

したがって本発明のシステムは、血友病、糖尿病、ムコ多糖症などのリソソーム蓄積症、例えばMPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VIおよびMPS VII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばパッテン病、およびムコリピドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症または副腎白質ジストロフィーの治療に使用することができる。

【0097】

50

本発明の更なる対象は、上記または本明細書中に定義したドナー核酸および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/または標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含むベクターである。

【0098】

本発明の文脈において、好ましくはドナー核酸および/または外来DNA配列および/またはアルブミンエキソンおよび/または逆位標的配列および/または標的配列および/または相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/またはヌクレアーゼおよび/またはイントロンは、上記で定義したとおりまたは本明細書中に定義したとおりである。

【0099】

好ましくは、ベクターはウイルスベクターであり、好ましくはレンチウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクター、または非ウイルスベクターであり、好ましくはカチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子(LNP)を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せから選択される。好ましくはAAV2/8ベクターが使用される。

10

【0100】

本発明の好ましい実施形態では、上記で定義したように、Cas9を発現する核酸を含む1つのベクターが、ドナーDNAおよび標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、すなわちgRNAを含む第二のベクターとともに使用される。

【0101】

本発明の別の好ましい実施形態では、上記で定義したように、Cas9および標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、すなわちgRNAを発現する核酸を含む1つのベクターが、ドナーDNAを含む第二のベクターとともに使用される。

20

【0102】

好ましくは、第一のベクターはCas9またはspCas9をコードする核酸を含み、好ましくは組織特異的プロモーター、例えば、肝臓ハイブリッド肝臓プロモーター(HLP)のような肝臓特異的プロモーターの制御下にある。前記ベクターは更にポリA、好都合には短い合成ポリA(synt.ポリA)を含み得る。好ましくは、第二のベクターは、上記で定義したgRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む。好ましくは、gRNA発現カセットは、U6プロモーターの下で、上記で定義したgRNAを含む。好ましくは、ドナーDNAはその3'および5'で逆位標的配列に挟まれ、好ましくは各PAMに連結される。

30

【0103】

好ましくは、ベクターはウイルスベクターであり、好ましくは、前記ウイルスベクターはレンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、マウスマローニーベースのウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、またはパルボウイルスベクターであり、好ましくは、アデノ随伴ウイルスは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVSH19、AAVPHP.B、AAV8、AAV6である。

40

【0104】

好ましくは前記ウイルスベクターまたはベクターは更に、5'末端反復(5'-TR)ヌクレオチド配列および3'末端反復(3'-TR)ヌクレオチド配列を含み、好ましくは5'-TRは5'逆位末端反復(5'-ITR)ヌクレオチド配列であり、3'-TRは3'逆位末端反復(3'-ITR)ヌクレオチド配列であり、好ましくは、ITRは同じウイルス血清型または異なるウイルス血清型に由来し、好ましくは、ウイルスはAAVであり、好ましくは血清型2である。

【0105】

50

一実施形態では、gRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む前記ウイルスベクターは更に、（好ましくはgRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む構築物の5'末端に位置する、好ましくはAAVの）5'逆位末端反復（ITR）配列と、（好ましくはgRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む構築物の3'末端に位置する、好ましくはAAVの）3'逆位末端反復（ITR）配列を含む。

【0106】

好ましくは、前記ITRは、配列番号110、配列番号29または66と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または有する。

【0107】

好ましくはgRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む前記ウイルスベクターは、
以下を含む： 10

- AAV 5'逆位末端反復（5'-ITR）配列；
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に連結された逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列；
- 1つ以上のアルブミンエキソン（好ましくはエキソン10、エキソン11、エキソン12、エキソン13およびエキソン14から選択される1つ以上のエキソン）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくはT2A）；
- 外来DNA配列（好ましくはヒトARSB遺伝子のコード配列）；
- 転写終結配列；
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に連結された更なる逆位標的配列； 20
- プロモーター（好ましくはU6プロモーター）の制御下にある、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド；
- キメラgRNA足場；および
- AAV 3'逆位末端反復（3'-ITR）配列。

【0108】

好ましくはgRNA発現カセットおよびドナーDNAを含む前記ウイルスベクターは、
以下を含む：

- AAV 5'逆位末端反復（5'-ITR）配列；
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に連結された逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列； 30
- 1つ以上のアルブミンエキソン（好ましくはエキソン13および14から選択される1つ以上のエキソン）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくはT2A）；
- 外来DNA配列（好ましくはヒトARSB遺伝子のコード配列）；
- 転写終結配列；
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に連結された更なる逆位標的配列；
- プロモーター（好ましくはU6プロモーター）の制御下にある、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド；
- キメラgRNA足場；および
- AAV 3'逆位末端反復（3'-ITR）配列。 40

【0109】

あるいは、ドナーDNAを含む前記ウイルスベクターは、以下を含む。

- AAV 5'逆位末端反復（5'-ITR）配列；
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列に連結された逆位標的配列；
- スプライサクセプター配列；
- 1つ以上のアルブミンエキソン（好ましくはエキソン10、エキソン11、エキソン12、エキソン13およびエキソン14から選択される1つ以上のエキソン）；
- リボソームスキッピング配列（好ましくはT2A）；
- 外来DNA配列（好ましくはヒトBDD F8遺伝子のコード配列）；
- 転写終結配列； 50

- そのプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列に連結された更なる逆位標的配列 ;
- A A V 3 ' 逆位末端反復 (3 ' - I T R) 配列。

【 0 1 1 0 】

あるいは、ドナー D N A を含む前記ウイルスベクターは、以下を含む :

- A A V 5 ' 逆位末端反復 (5 ' - I T R) 配列 ;
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列に連結された逆位標的配列 ;
- スプライサクセプター配列 ;
- 1 つ以上のアルブミンエキソン (好ましくはエキソン 1 3 および 1 4 から選択される 1 つ以上のエキソン) ;
- リボソームスキッピング配列 (好ましくは T 2 A) ;
- 外来 D N A 配列 (好ましくはヒト B D D F 8 遺伝子のコード配列) ;
- 転写終結配列 ;
- そのプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列に連結された更なる逆位標的配列 ;
- A A V 3 ' 逆位末端反復 (3 ' - I T R) 配列。

10

【 0 1 1 1 】

好適には、前記ベクターが g R N A 発現カセットを含まない場合、前記カセットはヌクレアーゼを発現する核酸を含むベクター中に含まれる。

【 0 1 1 2 】

上記エレメントは、上記で定義した 5 ' から 3 ' への順序であってもよいが、当業者が理解できるように、他の順序も同様に好適である。

20

【 0 1 1 3 】

前記ベクターは更に、追加の A A V 配列などの追加のウイルス配列を含み得る。

【 0 1 1 4 】

好ましくは、前記ドナー核酸および前記相補鎖オリゴヌクレオチドを含むベクターは、以下の配列 : 配列番号 2 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 3 3、配列番号 2 6、配列番号 2 0、配列番号 2 7、配列番号 2、配列番号 2 8 および配列番号 2 9 を含む配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【 0 1 1 5 】

別の実施形態では、前記ドナー核酸を含むベクターは、以下の配列 : 配列番号 1 1 0、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 2 0 および配列番号 2 9 を含む配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

30

【 0 1 1 6 】

本発明の別の対象は、上記で定義した構築物、ベクターまたはベクターシステムまたはシステムを含む宿主細胞である。

【 0 1 1 7 】

本発明の別の対象は、上記で定義した構築物、ベクター、ベクターシステムまたはシステムを含むウイルス粒子である。

【 0 1 1 8 】

好適には、本明細書中で定義したウイルスベクターは、ウイルスベクター粒子を包含する。

40

【 0 1 1 9 】

「ウイルス粒子」または「ウイルスの粒子」という用語は、非病原性ウイルス、特にウイルスベクターの細胞外形態を意味することを意図し、それは D N A または R N A のいずれかから作られた遺伝物質が、カプシドと呼ばれるタンパク質の被覆に包まれ、さらに場合によってはウイルス糖タンパク質を含む宿主細胞膜の一部に由来するエンベロープに包まれている。

【 0 1 2 0 】

本明細書で使用する場合、ウイルスベクターはウイルスベクター粒子も指す。

50

【0121】

本発明に包含されるウイルスベクターは、遺伝子治療に好適である。

【0122】

好ましくは、ウイルス粒子は、AAVのカプシドタンパク質を含む。

【0123】

好ましくは、ウイルス粒子は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAVSH19、AAVPHP、Bからなる群より選択される1つ以上の血清型のAAVのカプシドタンパク質を含み、好ましくはAAV2またはAAV8血清型のAAVのカプシドタンパク質を含む。

【0124】

本発明の別の対象は、以下の1つを含む医薬組成物である：上記で定義したシステム、1つ以上のベクター、宿主細胞またはウイルス粒子、および薬学的に許容される担体。

【0125】

本発明の別の対象は、以下を含むキットである：上記で定義したDNA構築物、システムまたは1つ以上のベクターまたは宿主細胞またはウイルス粒子、あるいは上記で定義した医薬組成物を1つ以上の容器中に含み、任意で、核酸構築物、ベクター、宿主細胞、ウイルス粒子または医薬組成物を患者に投与する方法を記載した指示書またはパッケージング材料を更に含む。

【0126】

上記で定義したシステムまたは1つ以上のベクターまたは宿主細胞またはウイルス粒子、あるいは上記で定義した医薬組成物は、好ましくは医薬としての使用、好ましくは本明細書中に言及した疾患、好ましくは肝臓疾患、ムコ多糖症（例えばMPSI、MPSII、MPSIIIA、MPSIIB、MPSIIC、MPSIVA、MPSIVB、MPSVI、MPSVII）を含むリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症（ファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、GM1ガングリオシドーシス）、リポフスチン症（バツテン病およびその他）およびムコリピドーシス；肝臓を治療用タンパク質の産生および分泌の工場として使用することができる他の疾患、例えば糖尿病、脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーの治療における使用のためのものである。

【0127】

上記で定義したシステムまたは1つ以上のベクターまたは宿主細胞またはウイルス粒子、あるいは上記で定義した医薬組成物は、野生型対立遺伝子と変異対立遺伝子の両方がドナーDNAによって提供される正しい遺伝子のコピーで置換される疾患、または機能喪失による劣性遺伝性疾患および一般的な疾患（好ましくは、前記疾患は、血友病、糖尿病、ムコ多糖症を含むリソソーム蓄積症、例えばMPSI、MPSII、MPSIIIA、MPSIIB、MPSIIC、MPSIVA、MPSIVB、MPSVIおよびMPSVII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバツテン病、およびムコリピドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーを含む）の治療に使用することができる。

【0128】

したがって上記で定義したシステムまたは1つ以上のベクターまたは宿主細胞またはウイルス粒子、あるいは上記で定義した医薬組成物は、血友病、糖尿病、ムコ多糖症などのリソソーム蓄積症、例えばMPSI、MPSII、MPSIIIA、MPSIIB、MPSIIC、MPSIVA、MPSIVB、MPSVIおよびMPSVII、スフィンゴ脂質症、例えばファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病およびGM1ガングリオシドーシス、リポフスチン症、例えばバツテン病、およびムコリピドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症または副腎白質ジストロフィーの治療に使用することができる。

【0129】

10

20

30

40

50

本発明の更なる対象は、ウイルス粒子の産生のための上記で定義した構築物である。

【0130】

本発明の目的はまた、上記で定義したベクターシステムまたはベクターまたは宿主細胞もしくはウイルス粒子または医薬組成物の有効量を被験体に投与することを含む、本明細書中に言及した疾患、好ましくは遺伝子の機能喪失による遺伝性疾患に罹患した被験体を治療する方法である。好ましくは、前記疾患はムコ多糖症(MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI、MPS VII)などのリソソーム蓄積症または血友病AもしくはBである。

【0131】

好ましくは、本明細書中に言及した配列は、本発明の対象である。

10

【0132】

好ましくは、ドナーDNAカセットエレメントおよび/またはgRNA発現カセットエレメントおよび/またはプロモーター配列および/またはgRNA発現用U6プロモーターおよび/またはgRNAおよび/またはgRNA標的部および/または逆位標的配列および/またはCas9および/または外来DNA配列および/または転写後調節エレメントおよび/または転写終結配列および/またはスプライスアクセプター配列および/またはリボソームスキッピング配列は、以下の配列番号1~109に示される配列である。

【0133】

本発明の別の対象は、上記で定義したとおりまたは本明細書中に定義したとおりの、ドナー核酸および/または標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチドおよび/または前記標的配列を認識するヌクレアーゼをコードする核酸を含むDNA構築物である。

20

【0134】

一実施形態では、本発明の方法は*ex vivo*または*in vitro*である。

【0135】

一実施形態では、本発明の方法において、細胞は被験体または患者由来の単離細胞である。

【0136】

アルブミンの配列は、好ましくは以下のアクセッション番号AC140220.4(GeneBank、NCBI、データベース;最新バージョン)または以下のアクセッション番号NC_000004.12で記載されている。

30

【0137】

本発明はまた、上記で定義した核酸または上記で定義したヌクレオチド配列または上記で定義したベクター、および薬学的に許容される希釈剤および/または賦形剤および/または担体を含む医薬組成物を提供する。

【0138】

好ましくは、組成物は更に治療剤を含み、好ましくは、前記治療剤は酵素補充療法および低分子療法からなる群より選択される。

【0139】

好ましくは、医薬組成物は、非経口、静脈内(例えば側頭静脈を介して)、腹腔内、腫瘍内、肝臓内、またはそれらの任意の組合せからなる群より選択される経路を介して投与される。好ましくは本発明のベクターは、静脈内または非経口経路を介して投与される。

40

【0140】

本発明はまた、上記で定義したベクターの医学的使用を提供し、前記ベクターは、非経口、静脈内(例えば側頭静脈を介して)、腹腔内、腫瘍内、肝臓内、またはそれらの任意の組合せからなる群より選択される経路を介して投与される。好ましくは本発明のベクターは、静脈内または非経口経路を介して投与される。

【0141】

本発明の好ましい実施形態では、

- 標的配列がアルブミン遺伝子のイントロン9内に位置する場合、アルブミンエクソン10、11、12、13および14またはそれらの断片が存在し;

50

- 標的配列がアルブミン遺伝子のイントロン 1 1 内に位置する場合、アルブミンエキソン 1 2、1 3 および 1 4 またはそれらの断片が存在し；
- 標的配列がアルブミン遺伝子のイントロン 1 2 内に位置する場合、アルブミンエキソン 1 3 および 1 4 またはそれらの断片が存在し；
- 標的配列がアルブミン遺伝子のイントロン 1 3 内に位置する場合、アルブミンエキソン 1 4 またはそれらの断片が存在し；
- 標的配列がアルブミン遺伝子のイントロン 1 4 内に位置する場合、アルブミンエキソンまたはそれらの断片は存在しない。

【0142】

本発明では、3 X F L A G 配列が存在し得、好ましくは、それは配列番号 5 6 または 6 2 と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。 10

【0143】

本発明において「少なくとも 8 0 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。本発明において「少なくとも 9 5 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。本発明において「少なくとも 9 8 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。好ましくは、% の同一性は、言及した配列の全長に関する。 20

【0144】

本発明には、本明細書中で言及したヌクレオチド配列に由来する核酸配列、例えば機能的断片、変異体、バリエーション、誘導体、類似体、および本明細書中で言及した配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列も含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0145】

< 定義 >

本明細書で使用する「含む (comprising)」、「含む (comprises)」、「含む (comprised of) 」および「含む (comprised of) 」という用語は、「含む (including) 」または「含む (includes) 」、 「含有する (containing) 」または「含有する (contains) 」と同義であり、包括的または開放的であって、追加の、記載されていないメンバー、エレメントまたはステップを排除しない。「含む (comprising) 」、 「含む (comprises) 」および「含む (comprised of) 」という用語はまた、「からなる (consisting of) 」という用語を含む。 30

【0146】

本発明において「少なくとも 8 0 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。本発明において「少なくとも 9 5 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。本発明において「少なくとも 9 8 % の同一性」とは、参照された配列に対して、少なくとも 9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性であり得ることを意味する。これは、言及した全ての % の同一性に適用される。好ましくは、% の同一性は、言及した配列の全長に関する。 40

【0147】

本発明には、本明細書中で言及したヌクレオチド配列に由来する核酸配列、例えば機能的断片、変異体、バリエーション、誘導体、類似体、および本明細書中で言及した配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する配列も、そのような断片、変異体、バリエーション、誘導体お 50

よび類似体が、それらが由来する配列の機能を維持する限り含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0148】

【図1】 *In vivo*における3' mAlb遺伝子座へのDsRed導入遺伝子の組込みおよび発現。野生型マウスは、生後1日齢(p1)に側頭静脈を介してAAV8-SpCas9およびAAV8-ドナー-gRNAの混合物(または陰性対照としてscRNA)を受けた。(A)HITI構築物およびマウス3'アルブミン遺伝子座への組込みの模式図。(B)T7エンドヌクレアーゼ(T7)切断アッセイによる代表的なインデル解析。予想されるバンドサイズおよび平均インデル頻度が示されている(n=5)。(C)特異的プライマーの組合せを用いた3' mAlb遺伝子座における正確な5'(左パネル)および3'(右パネル)結合産物を示す、肝臓サンプルから抽出したDNAのPCR。黒矢印は、予想されるバンドサイズを示す。(D)gRNAで処理したn=5頭およびscRNAで処理したn=5頭の動物の肝臓の凍結切片の20倍の倍率での代表的な蛍光顕微鏡画像。gRNA=HITIDo- gRNA+SpCas9; scRNA=HITIDo- scRNA+SpCas9。右パネルでは、Ds-Red陽性肝細胞の割合が報告されている。

【図2】新生児へのAAV-HITI投与後のアルブミン遺伝子3'末端への組込みは、MPSVIマウスモデルの表現型を改善する。(A)AAV-gRNA-HITIDo-およびAAV-Cas9構築物の模式図。SAS:合成スプライシングアクセプターシグナル; Exon14:マウスアルブミンのエキソン14; T2A:Those a a s i g n a ウイルス2Aスキッピングペプチド; spA:合成ウシ成長ホルモンポリA (B)正常(NR)、未処理のMPSVIマウス(AFNT)およびgRNA処理MPSVIマウス(AFgRNA)で測定した血清アルブミンスルファターゼB(ARSB)活性が報告されている。値は対数スケールで報告されている。(C)尿中グリコサミノグリカン(GAG)を、正常(NR)、未処理のMPSVIマウス(AFNT)およびgRNA処理MPSVIマウス(AFgRNA)で測定した。値は年齢をマッチさせたスクランブル対照に対するパーセンテージで報告されている。

【図3】新生児血友病マウスにおけるマウスAlb(mAlb)遺伝子座3'末端へのHITI媒介F8codopV3の組込み。(A)構築物の模式図。U6=U6プロモーター; gRNA=gRNA発現カセット; HLP=ハイブリッド肝臓プロモーター; Cas9=SpCas9コード配列; pA=ポリアデニル化シグナル; SAS=合成スプライシングアクセプター; Ex14=マウスアルブミンエキソン14; T2A=Those a a s i g n a ウイルス2Aスキッピングペプチド; F8=CodopV3のコード配列; pA=ポリアデニル化シグナル。(B)AF=未処理の血友病罹患マウス; NR=非罹患対照; HITI gRNA=Cas9+U6 gRNA発現カセットおよびHITIDo-で処理した罹患動物; HITI scRNA=Cas9+U6 scRNA発現カセットおよびHITIDo-で処理した罹患動物の血漿サンプルで実施した発色アッセイ。各ドットは異なる動物に対応する。F8活性は、国際単位/デシリットル(IU/dl)で報告されている。

【図4】血清アルブミンレベル。AAV-HITIで処理または未処理の全ての動物で、処理後p360で測定した血清アルブミンレベル。AFgRNA=AAV-HITIガイド(gRNA)ベクターで処理した罹患動物; AFscRNA=AAV-HITISクランブルRNA(scRNA)ベクターで処理した罹患動物; NR=非罹患未処理動物。各バーは単一の動物のアルブミンレベルに対応する。血清アルブミンは、(アルブミンのmg)/(血清のml)として表される。

【図5】マウスアルファフェトプロテイン(AFP)レベル。処理後p360に採取した血清サンプルで測定したAFPレベル。AFgRNA=AAV-HITIガイド(gRNA)ベクターで処理した罹患動物; AFscRNA=AAV-HITISクランブルRNA(scRNA)ベクターで処理した罹患動物; AF=未処理の罹患動物; NR=非罹患未処理動物。各バーは単一の動物のAFPレベルに対応する。AFPレベルは、(AFP

の ng) / (血清の ml) として表される。

【図6】AAV-HITI サンプルのCAST-seq解析。3頭の異なるAAV-HITI gRNA処理MPSVI マウスの肝臓サンプルから抽出したゲノムDNAで実施したCAST-seq解析の視覚的表示。

【図7】MPSVI マウスを治療するためのAAV-HITIの用量反応。血清活性ARSBレベルを示す。処理、遺伝型および時点をグラフの下に記す。各ドットは1頭のマウスを表し、平均レベルを各バー内に記す(LD処理については各バーの上)。ARSBを発現する非罹患マウスの正常レベルを点線で示し、平均±平均の標準誤差として報告する(Alliegro & Ferla et al., 2016より)。NT = 未処理; HD = 高用量; MD = 中用量; LD = 低用量; AF = 罹患マウスまたはArsb^{-/-}マウス; p30 = 生後30日齢。

10

【図8】3'ALB遺伝子座におけるINDELの評価。T7エンドヌクレアーゼ(T7)切断アッセイによる代表的なインデル解析。予想されるバンドサイズを黒矢印で示し、インデルの%を各gRNAレーンの下に報告し、平均±平均の標準誤差として示す(n = 3回の独立した実験)。分子量マーカーは100bpマーカーである。scRNA = ス克蘭ブルRNA; + = T7酵素処理サンプル; - = T7酵素未処理サンプル; SEM = 平均の標準誤差

【図9】In vitroでの3'Alb遺伝子座または3'ALB遺伝子座へのHITI媒介組込み。3'Alb遺伝子座または3'ALB遺伝子座へのプロモーターレスDsRedコード配列を有するドナーDNAの組込みの結果としてのDsRed陽性(DsRed+)細胞の定量。gRNAによって誘導された組込みの結果としてのDsRed+細胞数を、スクランブルRNA(scRNA)を受けたサンプルに対して正規化し、Cas9に連結したEGFP陽性細胞の%として報告する。細胞株、gRNA IDおよびAlbまたはALBの標的イントロンをグラフの下に報告する。各ドットは、トランスフェクションした細胞の生物学的反復を表す。scRNA = ス克蘭ブルRNA; HEPA 1-6 = マウス肝癌細胞株1-6; HUH7 = ヒト肝癌細胞株7; Alb = マウスアルブミン; intr = イントロン; ALB = ヒトアルブミン。

20

【図10A】マウスにおけるオンターゲット部位およびオフターゲット部位でのAAV-HITIの分子特性評価。A) Illumina-seq NGS解析により得られたオンターゲット部位でのインデル率(%)。AAV-HITI gRNA処理マウスは、オンターゲット部位で29%のインデルを示したのに対し、AAV-HITI scRNA処理マウスでは、インデル率はほぼゼロであった。

30

【図10B】B) Illumina-seqで生成されたリードをオンターゲット部位にアラインメントして、AAVゲノムの組込みの可能性を検出した。ITR配列を含むリードは、AAV-HITIまたはAAV-Cas9ゲノムのいずれかを参照として使用した場合に濃縮された。

【図10C】C) AAV-HITI gRNAおよびAAV-HITI scRNAマウス由来のDNAサンプルで予測された上位10のオフターゲット部位で実施したNGSオフターゲット解析は、本発明者らが選択したgRNAがオンターゲット部位(マウスアルブミンイントロン13)に特異的であることを示した。

40

【図10D】

【0149】

<アルブミン遺伝子>

アルブミン遺伝子は、アルブミンプロモーターの制御下で発現させる外来DNA配列を挿入するために、本発明のgRNAによって認識される標的ゲノム遺伝子座である。

【0150】

アルブミンの配列は、好ましくは以下のアクセッション番号AC140220.4または以下のアクセッション番号NC_000004.12で記載されている。

【0151】

アルブミン遺伝子(ENSMUSG00000029368)は第5染色体上に位置し

50

、3つの選択的転写バリエーションを有し、そのうちの1つ(ENSMUST00000031314.10、15個のエキソンを含む)のみがアルブミンタンパク質(P07724、608aa)をコードする。

【0152】

アルブミンタンパク質は血漿中に豊富に存在し、血中のステロイドや脂肪酸などの様々な分子の担体タンパク質として機能し、膠質浸透圧の維持に不可欠である。この遺伝子は主に肝臓で発現され、コードされたタンパク質は血漿中に分泌される前にタンパク質分解処理を受ける。[RefSeqによる提供；2015年10月]

<治療用遺伝子およびタンパク質>

本発明の治療用遺伝子は、1つ以上の遺伝性疾患、例えば、ムコ多糖症(MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI)を含むリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症(ファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、GM1ガングリオシドーシス)、リポフスチン症(バッテン病および他のもの)およびムコリポドーシス；脳回状脈絡網膜萎縮症、糖尿病、アデニコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーの原因となる遺伝子である。

【0153】

特に好ましい本発明の治療用遺伝子は、同じ組織内または他の組織の欠陥を修正するために肝細胞によって発現され得る遺伝子である。

【0154】

好適には、本発明によれば、肝臓内または異なる組織の遺伝的欠陥を修正するための治療用タンパク質の産生および分泌の工場として肝臓を使用することができる。

【0155】

本発明の治療用遺伝子はまた、劣性疾患(常染色体性または伴性遺伝性)において機能喪失を示す遺伝子である。

【0156】

<第VII因子>

第VII因子遺伝子(ENSG00000185010、遺伝子別名:FVIIまたはF8またはDXS1253EまたはF8CまたはHEMA)はX染色体(Xq28)上に位置し、血液凝固の内在性経路に關与する凝固第VII因子をコードする。第VII因子は第IXa因子の補因子であり、Ca²⁺およびリン脂質の存在下で、第X因子を活性型のXaに変換する。この遺伝子は2つの選択的にスプライシングされた転写産物を生成する。転写バリエーション1(ENST00000360256.9、26エキソン)は、大きな糖タンパク質であるアイソフォームaをコードする。それは血漿中を循環しフォンビルブランド因子と非共有結合性の複合体を形成する。このタンパク質は複数の切断を受ける。転写バリエーション2(ENST00000330287.10、5エキソン)は、主に第VIIc因子のリン脂質結合ドメインからなる推定小タンパク質アイソフォームbをコードする。この結合ドメインは凝固活性に不可欠である。少なくとも7つの選択的転写産物がアノテーションされている(Ensembl.org)。この遺伝子の欠陥は、一般的な劣性X連鎖性凝固障害である血友病Aをもたらす。[RefSeqより

提供；2008年7月]
第VII因子の配列は、好ましくは以下のアクセッション番号NM_000132.4で記載されている。

第VII因子のいくつかの修飾が、例えばMiao, H. Z. et al. Bioengineering of coagulation factor VII for improved secretion. Blood (2004)に記載されているように、その安定性および活性を改善するために操作されている。WT F8タンパク質のアミノ酸740~1649(Bドメイン)が欠失しているBドメインの欠失に加えて、Miao, H. Z. et al. Bioengineering of coagulation factor VII for improved secretion. Bl

ood (2004) および Ward et al. (Ward, N. J. et al. Codon optimization of human factor VIIIC DNAs leads to high-level expression. Blood (2011)) に記載されているように、通常起こる翻訳後修飾の一部を模倣することによって、FVIIIF分泌をさらに改善するために、リンカー（例えばN6リンカー）が操作されてきた。

【0157】

好適には、第VIIIF因子コード配列の断片は、本発明の範囲内である。

【0158】

修飾された第VIIIF因子もまた、本発明の範囲内である。

10

【0159】

好適には、第VIIIF因子コード配列またはその断片、例えばBDD第VIIIF因子コード配列のコード最適化バージョンは、本発明の範囲内である。

【0160】

< アリルスルファターゼB (ARSB) >

アリルスルファターゼB (ARSB) をコードする遺伝子 (ENSG00000113273) は第5染色体上に位置し、少なくとも7つの選択的転写産物がアノテーションされている (ensembl.org)。アイソフォーム1 (ENST00000264914.10、8エキソン; RefSeq NM_000046.5に対応) は、533aタンパク質 (P15848-1) をコードする。この遺伝子によってコードされるアリルスルファターゼBはスルファターゼファミリーに属する。アリルスルファターゼBホモ二量体は、N-アセチル-D-ガラクトサミン、コンドロイチン硫酸およびデルマタン硫酸の硫酸基を加水分解する。このタンパク質はリゾチームを標的とする。ムコ多糖症VI型は、アリルスルファターゼBの欠損によって生じる常染色体劣性リソソーム蓄積症である。(RefSeqより提供; 2016年12月)。

20

【0161】

アリルスルファターゼB (ARSB) の配列は、好ましくは以下のアクセッション番号 NM_000046.5 で記載されている。

【0162】

< DNA 構築物 >

30

< 外来DNA配列 >

上記で言及した外来DNA配列は、標的ゲノムのゲノムDNAに組み込まれるDNA断片を含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは少なくとも遺伝子の一部を含む。外来DNAは、発現されなければならない因子の野生型遺伝子または「コード最適化」配列に関連するコード配列、例えばcDNAを含み得る。いくつかの実施形態では、外来DNAは少なくとも遺伝子の1つのエキソンを含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは遺伝子のエンハンサーエレメントを含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは、遺伝子の3'部分に融合した遺伝子の5'部分を含む遺伝子の不連続な配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは野生型遺伝子配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは変異遺伝子配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNAは野生型遺伝子配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配列はレポーター遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、レポーター遺伝子は、Discosoma Red (Dsred)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、および β -グルクロニダーゼの少なくとも1つから選択される。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、遺伝子の転写調節エレメントを含み、それは例えば、エンハンサー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、1つ以上のエキソンまたはそれらの断片を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、1つ以上のイントロンまたはそれらの断片を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、3'非翻訳領域または5'非翻訳領域の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は人工DNA配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配

40

50

列は核局在化配列および/または核外搬出配列を含む。いくつかの実施形態では、外来DNA配列はシグナルペプチド配列を含む。外来DNA配列は、いくつかの実施形態では、標的ゲノム遺伝子座に組み込まれる核酸のセグメントを含む。外来DNA配列は、いくつかの実施形態では、1つ以上の目的のポリヌクレオチドを含む。外来DNA配列は、いくつかの実施形態では、1つ以上の発現カセットを含む。そのような発現カセットは、いくつかの実施形態では、目的の外来DNA配列、選択マーカーおよび/またはレポーター遺伝子をコードするポリヌクレオチド、および発現に影響を与える制御成分を含む。外来DNA配列は、いくつかの実施形態では、ゲノム核酸を含む。ゲノム核酸は、動物、マウス、ヒト、非ヒト、げっ歯類、非ヒト、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、シカ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、フェレット、霊長類（例えば、マーモセット、アカゲザル）、家畜化哺乳類または農業用哺乳類、鳥類、細菌、古細菌、ウイルス、または目的の任意の他の生物、あるいはそれらの組合せに由来する。任意の好適なサイズの外来DNA配列が標的ゲノムに組み込まれる。いくつかの実施形態では、ゲノムに組み込まれる外来DNA配列は、0.5未満、約0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5または10キロベース(kb)の長さである。いくつかの実施形態では、ゲノムに組み込まれる外来DNA配列は、少なくとも約0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5kbの長さである。

10

【0163】

<ゲノム挿入部位>

20

二本鎖切断(DSB)の部位は、任意の好適な技術、例えば本明細書中に開示されるCRISPR/Cas9システムおよびガイドRNAを使用して、特異的に導入することができる。本発明では、DSBはアルブミン遺伝子のイントロン9、イントロン11、イントロン12、イントロン13またはイントロン14に導入される。例示的なゲノム挿入部位は、ヒトアルブミン遺伝子のイントロン9の733位、イントロン11の152位、イントロン12の538位、イントロン12の927位、イントロン13の173位、イントロン13の456位またはイントロン14の123位であり、位置は各イントロンの最初のヌクレオチドを示す。

【0164】

ヌクレアーゼは、好ましくは配列番号1~2、配列番号9~18から選択される配列を含むかまたはそれからなるgRNAによって、前記挿入部位に誘導される。

30

【0165】

[リボソームスキッピング配列：2A自己切断ペプチド]

リボソームスキッピング配列は、本明細書では2A自己切断ペプチドまたは2Aペプチドの同義語として使用される。

【0166】

これらは、細胞内で組換えタンパク質の切断を誘導することができる18~22aa長のペプチドである。2Aペプチドは、ウイルスのゲノムの2A領域に由来する。

【0167】

2Aペプチドファミリーの4つのメンバーが生命科学研究で頻繁に使用されている。それらはP2A、E2A、F2AおよびT2Aである。F2Aは口蹄疫ウイルス18に由来し；E2Aはウマ鼻炎Aウイルスに由来し；P2Aはブタテシオウイルス-1 2Aに由来し；T2AはThos e a a s i g n aウイルス2に由来する。

40

【0168】

50

【表 1】

名称	配列
T2A	GSG E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号39) E G R G S L L T C G D V E E N P G P (配列番号32)
P2A	GSG A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号40) A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P (配列番号89)
E2A	GSG Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号41) Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P (配列番号90)
F2A	GSG V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号42) V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P (配列番号91)

10

【0169】

任意のリボソームスキッピング配列を本発明の意味の範囲内で利用することができる。好ましいものはT2Aである。リボソームスキッピングペプチド、例えば2Aペプチドは、好ましくはアルブミンエキソンと外来DNA配列との間に局在する。

【0170】

20

< スプライシングアクセプター配列 >

RNAスプライシングは、新しく作製された前駆体メッセンジャーRNA (pre-mRNA) 転写産物が成熟メッセンジャーRNA (mRNA) に変換されるRNAプロセスの形態である。スプライシングの間、イントロン(非コード領域)は除去され、エキソン(コード領域)は互いに連結される。

【0171】

イントロン内では、ドナー部位(イントロンの5'末端)、分岐点部位(イントロンの3'末端近傍)およびアクセプター部位(イントロンの3'末端)がスプライシングに必要とされる。スプライスドナー部位は、より大きな、あまり高度に保存されていない領域内のイントロンの5'末端に、ほぼ不変のGU配列を含む。イントロンの3'末端におけるス
プライシングアクセプター部位は、ほぼ不変のAG配列でイントロンを終結させる。AG
の上流(5'側)にはピリミジン(CおよびU)に富む領域、またはポリピリミジントラ
クトが存在する。ポリピリミジントラクトのさらに上流には分岐点が存在する。

【0172】

「スプライシングアクセプター配列」は、イントロンの3'末端においてアクセプター部位として機能し得るヌクレオチド配列である。ヒトスプライス部位領域のコンセンサス配列および頻度は、Ma, S. L., et al., 2015. PLoS One, 10(6), p. e0130729に記載されている。

【0173】

好適には、スプライシングアクセプター配列は、ヌクレオチド配列(Y)_nNYAG (nは10~20である)、または少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有するバリエーションを含み得る。好適には、スプライシングアクセプター配列は、配列(Y)_nNCAG (nは10~20である)、または少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有するバリエーションを含み得る。

【0174】

< 調節エレメント >

本発明の構築物は、1つ以上の調節エレメントを含み得、それは転写前または転写後に作用し得る。1つ以上の調節エレメントは、本発明の細胞における発現を促進し得る。

【0175】

「調節エレメント」は、ポリペプチドの発現を促進する、例えば転写産物の発現を増加

50

させるかまたは mRNA 安定性を高める任意のヌクレオチド配列である。好適な調節エレメントには、例えばプロモーター、エンハンサーエレメント、転写後調節エレメントおよびポリアデニル化部位が含まれる。

【0176】

本発明はまた、構築物を含むベクターを発現させることが意図されている宿主細胞において機能的である調節エレメントを含み得る構築物に関する。当業者は、適切な宿主細胞、例えば哺乳類またはヒト宿主細胞における使用のための調節エレメントを選択することができる。調節エレメントには、例えば、プロモーター、転写終結配列、翻訳終結配列、エンハンサー、シグナルペプチド、分解シグナルおよびポリアデニル化エレメントが含まれる。

10

【0177】

本発明の構築物は、任意で転写終結配列、翻訳終結配列、シグナルペプチド配列、内部リボソーム侵入部位 (IRES)、エンハンサーエレメント、および/またはウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) 転写後調節エレメント (WPRE) などの転写後調節エレメントを含み得る。転写終結領域は、典型的には、真核生物またはウイルスの遺伝子配列の 3' 非翻訳領域から得ることができる。転写終結配列は、効率的な終結を提供するために、コード配列の下流に位置させることができる。本発明のシステムでは、転写終結部位が通常、含まれる。

【0178】

<プロモーター>

本発明の核酸構築物は、所望のポリペプチドをコードする核酸配列と作動可能に連結されたプロモーター配列を含み得る。「作動可能に連結された」という用語は、その部分 (例えば、導入遺伝子およびプロモーター) が、両者がその機能を実質的に妨げられることなく遂行することを可能にする形で連結されていることを意味する。

20

【0179】

本発明の意味の範囲内のプロモーターは、ユビキタスプロモーター、すなわち広範囲の細胞および組織における遺伝子の発現を駆動するプロモーターであり得る。本発明の更なるプロモーターは、1つまたは一群の組織において選択的活性を示すが、他の組織においては活性が低いかまたは活性を示さない組織特異的プロモーターである。プロモーターは、別の因子、例えば宿主細胞中に存在する因子の存在に応答して誘導性の発現を示し得る。

30

【0180】

構築物を含むベクターが治療のために投与される場合、プロモーターは標的細胞 (例えば肝細胞) において機能的であることが好ましい。

【0181】

いくつかの実施形態では、プロモーターはユビキタスプロモーターまたは肝臓特異的プロモーター、好ましくは肝細胞特異的プロモーターである。本発明において使用が想定されるプロモーターには、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター (KF853603.1, bp 149~735)、U6 プロモーター [37, 38]、チロキシン結合グロブリン (TBG) プロモーター、ハイブリッド肝臓特異的プロモーター (HLP) などの天然の遺伝子プロモーターまたはそれらの断片が含まれるが、これらに限定されない。しかしながら、当該技術分野において既知の任意の好適なプロモーターを使用することができる。好ましい実施形態では、プロモーターは CMV、HLP または U6 プロモーターである。

40

【0182】

好ましい実施形態では、プロモーターは、例えば配列番号 27 のプロモーターまたはその断片などの U6 プロモーターである。

【0183】

好ましくは、配列番号 27、46、59 または 61 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% のヌクレオチド同一性を有

50

するプロモーターヌクレオチド配列、またはその断片であり、好ましくはプロモーターは配列番号 27、46、59 または 61 のプロモーターの天然の機能を実質的に保持する。

【0184】

プロモーターは、当該技術分野において既知の標準的な技術を使用して構築物中に組み込むことができる。プロモーターの多重コピーまたは複数のプロモーターを本発明の構築物において使用することができる。一実施形態では、プロモーターは転写開始部位から、その天然の遺伝的環境における転写開始部位からの距離とほぼ同じ距離に配置することができる。この距離の多少の変動は、プロモーター活性の実質的な低下なしで許容される。

【0185】

< ポリアデニル化配列 >

本発明の核酸構築物は、ポリアデニル化配列を含み得る。好適には、導入遺伝子はポリアデニル化配列と作動可能に連結される。ポリアデニル化配列は、導入遺伝子の下流に挿入されて、導入遺伝子の発現を改善し得る。

【0186】

ポリアデニル化配列は、通常、ポリアデニル化シグナル、ポリアデニル化部位および下流エレメントを含む；ポリアデニル化シグナルは、RNA 切断複合体によって認識される配列モチーフを含む；ポリアデニル化部位は、ポリAテールが mRNA に付加される切断部位である；下流エレメントは、通常、ポリアデニル化部位の直下に位置する GT に富む領域であり、効率的な処理に重要である。

【0187】

いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列はウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化配列または SV40 ポリアデニル化配列；またはポリアデニル化配列の天然の機能を保持するそれらの断片である。

【0188】

好ましい実施形態では、ポリアデニル化配列はウシ成長ホルモン (bGH) ポリアデニル化配列、最も好ましくは短い合成ポリAである。

【0189】

本発明の好ましいポリアデニル化配列は、配列番号 26 または配列番号 37 または配列番号 48 または配列番号 65 である。

【0190】

いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、配列番号 26 または配列番号 37 または配列番号 48 または配列番号 65 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の核酸同一性を有する核酸配列を含むか、またはそれからなり、好ましくは、ポリアデニル化配列は配列番号 26 または配列番号 37 または配列番号 48 または配列番号 65 のポリアデニル化配列の天然の機能を実質的に保持する。

【0191】

< 転写後調節エレメント >

本発明の核酸構築物は、転写後調節エレメントを含み得る。好適には、タンパク質コード配列は、遺伝子発現を改善し得る 1 つ以上の更なる転写後調節エレメントと作動可能に連結される。

【0192】

本発明の構築物は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) を含み得る。

【0193】

好適な WPRE 配列は当該技術分野の当業者によく知られている (例えば、Zuffrey et al. (1999) Journal of Virology 73: 2886 - 2892; Zanta-Boussif et al. (2009) Gene Therapy 16: 605 - 619 を参照)。好適には、WPRE は野生型 WPRE または変異型 WPRE である。例えば、WPRE は、例えば WHX ORF 翻訳開始コード

10

20

30

40

50

ンを変異させることによって、ウッドチャック肝炎ウイルスXタンパク質(WHX)の翻訳を抑制するように変異させられ得る。

【0194】

好ましくは、WPREは配列番号25と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、または本質的に有する。

【0195】

<Kozak配列>

本発明の核酸構築物は、Kozak配列を含み得る。Kozak配列は作動可能に連結される。Kozak配列は、翻訳の開始を改善するために、開始コドンの前に挿入することができる。

【0196】

好適なKozak配列は当業者によく知られている(例えば、Kozak(1987) *Nucleic Acids Research* 15:8125-8148を参照)。

【0197】

<ガイドRNA>

「ガイドRNA」(gRNA)は、RNA誘導ヌクレアーゼに標的配列特異性を付与する。ガイドRNAは、相補的な標的DNA配列に結合する短い非コードRNA配列である。例えば、CRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNAは最初にCas9酵素に結合し、gRNA配列は塩基対形成を介して得られた複合体をDNA上の特定の位置へと誘導し、そこでCas9は標的DNA鎖を切断することで、そのヌクレアーゼ活性を発揮する。

【0198】

「ガイドRNA」という用語は、特定のヌクレアーゼ、例えばCas9と適合性のあるgRNAのみならず、任意のRNA誘導ヌクレアーゼで使用することができる任意の好適なgRNAを包含する。

【0199】

ガイドRNAは、ステムループ構造を提供するトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) および目的の遺伝子標的部位を切断するように設計された標的的特異的CRISPR RNA (crRNA) を含み得る。tracrRNA および crRNA は、例えばそれらを95℃で5分間加熱し、室温まで10分間かけてゆっくりと冷却することによってアニリングすることができる。あるいは、ガイドRNAは、crRNA および tracrRNA の両方を単一の構築物としてなる単一ガイドRNA (sgRNA) であり得る。

【0200】

ガイドRNAは、ヌクレアーゼ結合のための足場を形成する3'末端、および異なるDNA部位を標的とするようにプログラム可能な5'末端を含み得る。例えば、CRISPR-Cas9の標的的特異性は、ガイドRNAの5'末端の15~25bpの配列によって決定され得る。所望の標的配列は、通常、CRISPR-Cas9などのCRISPRシステムによる切断のために標的化されるDNA領域に続く2~6bpの長さの短いDNA配列であるプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)に先行する。PAMはCasヌクレアーゼが切断するために必要とされ、通常、切断部位の下流3~4bpに見出される。ガイドRNAの標的との塩基対形成の後に、Cas9はPAMの上流約3-ntで二本鎖切断を媒介する。

【0201】

ガイドRNAを設計するための多数のツールが存在する(例えば、Cui, Y., et al., 2018. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10(2), pp. 455-465)。例えば、COSMIDは、ガイドRNAを同定および検証するためのウェブベースのツールである(Cradick TJ, et al. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2014; 3(12): e214)。

10

20

30

40

50

【0202】

<キメラRNA足場>

キメラgRNA足場は、標的DNAにおいて部位特異的な二本鎖切断を導入するためにCas9エンドヌクレアーゼを誘導する二重RNA構造であり、Casヌクレアーゼの効率を高めるとされている(Martin Jinek # et al. 2012 A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity)。本発明の範囲内では、配列番号28または60の好ましいキメラRNA足場が使用される。

【0203】

<RNA誘導遺伝子編集>

本発明のベクターシステムは、外来DNA配列を細胞中に送達するために使用することができる。次いで、前記外来DNA配列は、非相同末端結合(NHEJ)によって二本鎖切断(DSB)の部位において細胞のゲノム中に導入することができる。二本鎖切断(DSB)の部位は、任意の好適な技術、例えばRNA誘導遺伝子編集システムを使用することによって特異的に導入することができる。

【0204】

「RNA誘導遺伝子編集システム」は、DSBを導入するために使用することができ、通常、ガイドRNAおよびRNA誘導ヌクレアーゼを含む。CRISPR/Cas9システムは、一般的に使用されるRNA誘導遺伝子編集システムの一例であるが、他のRNA誘導遺伝子編集システムも使用することができる。

【0205】

<ヌクレアーゼ>

標的配列を認識するヌクレアーゼは当該技術分野の当業者によって知られており、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、クラスター化された規則的な間隔の短い回文繰り返し(CRISPR)ヌクレアーゼ、およびメガヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。組成物中に見出され、本明細書中に開示される方法において有用なヌクレアーゼを以下により詳細に記載する。

【0206】

<亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)>

「亜鉛フィンガーヌクレアーゼ」または「ZFN」は、FokIの切断ドメインと、3つ以上の亜鉛フィンガーモチーフを含むDNA認識ドメインとの融合物である。DNAの特定の位置における2つの個別のZFNの正確な方向および間隔でのヘテロ二量体化は、DNAの二本鎖切断をもたらす。場合によっては、ZFNは切断ドメインを各亜鉛フィンガードメインのC末端に融合させる。2つの切断ドメインが二量体化してDNAを切断することを可能にするために、2つの個別のZFNは、それらのC末端が一定の距離を隔ててDNAの反対鎖に結合する。場合によっては、亜鉛フィンガードメインと切断ドメインとの間のリンカー配列は、各結合部位の5'末端が約5~7bp離れていることを必要とする。本発明において有用な例示的なZFNには、Urnov et al., Nature Reviews Genetics, 2010, 11: 636-646; Gaj et al., Nat Methods, 2012, 9(8): 805-7; 米国特許第6,534,261号; 6,607,882号; 6,746,838号; 6,794,136号; 6,824,978号; 6,866,997号; 6,933,113号; 6,979,539号; 7,013,219号; 7,030,215号; 7,220,719号; 7,241,573号; 7,241,574号; 7,585,849号; 7,595,376号; 6,903,185号; 6,479,626号; ならびに米国特許出願公開第2003/0232410号および第2009/0203140号に記載のものが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ZFNは亜鉛フィンガーニッカーゼであり、いくつかの実施形態では、それは部位特異的な一本鎖DNA切断またはニックを誘導する操作されたZFNである。亜鉛フィンガーニッカーゼの記載は、例えば、Ramirez et al., Nucl Acids Res, 2012, 40(12)

10

20

30

40

50

: 5560 - 8 ; Kim et al. , Genome Res , 2012 , 22 (7)
: 1327 - 33に見出される。

< TALEN >

「TALEN」または「TALエフェクターヌクレアーゼ」は、DNA結合タンデムリピートの中央ドメイン、核局在化シグナル、およびC末端転写活性化ドメインを含む操作された転写活性化様エフェクターヌクレアーゼである。いくつかの実施例では、DNA結合タンデムリピートは長さが33～35アミノ酸を含み、1つ以上の特定のDNA塩基対を認識する12位および13位の2つの超可変アミノ酸残基を含む。TALENは、TALエフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインに融合することによって産生される。例えば、TALEタンパク質は、野生型または変異型FokIエンドヌクレアーゼ、またはFokIの触媒ドメインなどのヌクレアーゼに融合することができる。TALENにおけるその使用のために、FokIにはいくつかの変異が加えられており、それは例えば、切断特異性または活性を改善する。そのようなTALENは、任意の所望のDNA配列に結合するように設計される。TALENは、多くの場合、標的DNA配列に二本鎖切断を作り、次いでNHEJまたはHDRを経ることによって遺伝子改変を起こすために使用される。場合によっては、一本鎖ドナーDNA修復鋳型が、HDRを促進するために提供される。TALENおよびそれらの遺伝子編集のための使用の詳細な記載は、例えば、米国特許第8,440,431号;8,440,432号;8,450,471号;8,586,363号;および8,697,853号;Scharenberg et al. , Curr Gene Ther , 2013 , 13 (4) : 291 - 303 ; Gaj et al. , Nat Methods , 2012 , 9 (8) : 805 - 7 ; Beurdaley et al. , Nat Commun , 2013 , 4 : 1762 ; および、Joung and Sander , Nat Rev Mol Cell Biol , 2013 , 14 (1) : 49 - 55に見出される。

10

20

< DNA誘導ヌクレアーゼ >

「DNA誘導ヌクレアーゼ」は、別の核酸（例えば細胞のゲノム中の標的核酸）にハイブリダイズすることによって、ヌクレアーゼをゲノム中の正しい位置に誘導するために、一本鎖DNAの相補的ヌクレオチドを使用するヌクレアーゼである。いくつかの実施形態では、DNA誘導ヌクレアーゼはアルゴノートヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、DNA誘導ヌクレアーゼは、TtAgo、PfAgo、およびNgAgoから選択される。いくつかの実施形態では、DNA誘導ヌクレアーゼはNgAgoである。

30

【0207】

< メガヌクレアーゼ >

「メガヌクレアーゼ」は、特定の実施形態では、少なくとも12塩基対、例えば12～40塩基対または12～60塩基対の長さの範囲のDNA標的部位を認識する、高度に特異的な希少切断エンドヌクレアーゼまたはホーミングエンドヌクレアーゼである。

【0208】

本明細書で使用することが考えられる任意のメガヌクレアーゼには、I-Scel、I-Scell、I-SceIII、I-SceIV、I-SceV、I-SceVI、I-SceVII、I-CeuI、I-CeuAIIIP、I-Crel、I-CrepsbIIIP、I-CrepsbIIIP、I-CrepsbIVP、I-TliI、I-Ppol、PI-PspI、F-Scel、F-Scell、F-SuvI、F-TevI、F-TevII、I-Amal、I-Anil、I-Chul、I-Cmoel、I-Cpal、I-CpaII、I-Csml、I-Cvul、I-CvuAIP、I-Ddil、I-DdII、I-DirI、I-Dmol、I-Hmul、I-HmuII、I-HsNIP、I-Llal、I-Msol、I-Naal、I-NanI、I-NcIIP、I-NgrIP、I-NitI、I-Njal、I-Nsp236IP、I-PakI、I-PboIP、I-PcuIP、I-PcuAI、I-PcuVI、I-PgrIP、I-PobIP、I-PorI、I-PorIIP、I-PbpIP、I-SpBetaIP、I-Scal、I-SexIP、I-SneIP、

40

50

I - S p o m l、I - S p o m C P、I - S p o m I P、I - S p o m I I P、I - S q u I P、I - S s p 6 8 0 3 I、I - S t h P h i J P、I - S t h P h i S T 3 P、I - S t h P h i S T e 3 b P、I - T d e I P、I - T e v l、I - T e v I I、I - T e v I I I、I - U a r A P、I - U a r H G P A I P、I - U a r H G P A 1 3 P、I - V i n l P、I - Z b i I P、P I - M t u I、P I - M t u H I P、P I - M t u H I I P、P I - P f u I、P I - P f u I I、P I - P k o I、P l - P k o I I、P I - R m a 4 3 8 1 2 I P、P I - S p B e t a I P、P I - S c e I、P I - T f u l、P I - T f u I I、P I - T h y l、P I - T l i l、P I - T H I I、I - C r e l メガヌクレアーゼ、I - C e u l メガヌクレアーゼ、I - M s o l メガヌクレアーゼ、I - S c e l メガヌクレアーゼ、またはそれらの任意の活性バリエーション、断片、変異体もしくは誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

【0209】

<CRISPR>

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; クラスタ化された規則的な間隔の短い回文繰り返し) / Cas (CRISPR-associated protein; クリスピー関連タンパク質) ヌクレアーゼシステムは、ゲノム工学のために使用される細菌システムに基づく人工ヌクレアーゼシステムである。それは部分的に、多くの細菌および古細菌の適応免疫応答に基づいている。ウイルスまたはプラスミドが細菌に侵入するとき、侵入者のDNAのセグメントは「免疫」応答によってCRISPR RNA (crRNA) に変換される。次いでcrRNAは、部分的相補性の領域を介して、tracrRNAと呼ばれる別のタイプのRNAと結合し、crRNAに相同な標的DNA中の領域である「プロトスペーサー」へとCas (例えばCas9) ヌクレアーゼを誘導する。Cas (例えばCas9) ヌクレアーゼは、crRNA転写産物中に含まれる20ヌクレオチド相補鎖配列によって特定される部位でDNAを切断し、二本鎖切断においてプラント末端を生成する。Cas (例えばCas9) ヌクレアーゼは、いくつかの実施形態では、部位特異的DNA認識および切断のために、crRNAおよびtracrRNAの両方を必要とする。このシステムは現在、特定の実施形態では、crRNAおよびtracrRNAが1つの分子(「単一ガイドRNA」または「sgRNA」)に結合され、単一ガイドRNAのcrRNA相当部分が任意の所望の配列を標的とするようにCas (例えばCas9) ヌクレアーゼを誘導するよう設計されている(例えば、Jinek et al. (2012) Science 337: 816-821; Jinek et al. (2013) eLife 2: e00471; Segal (2013) eLife 2: e00563を参照)。

【0210】

本明細書で使用される場合、tracrRNAは足場gRNAとしても定義される。したがって、CRISPR/Casシステムは、細胞のゲノム中の所望の標的に二本鎖切断を生成し、相同性指向性修復(HDR)または非相同末端結合(NHEJ)による誘導された切断を修復するために細胞の内因性メカニズムを利用するように設計することができる。いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、DNA切断活性を有する。Casヌクレアーゼは、いくつかの実施形態では、標的DNA配列中の位置で一方または両方の鎖の切断を指示する。例えば、いくつかの実施形態では、Casヌクレアーゼは、標的DNA配列の一本鎖を切断する1つ以上の不活性化触媒ドメインを有するニックナーゼである。Casヌクレアーゼの非限定的な例には、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCsnx12としても知られる)、Cas10、Cpf1、C2c3、C2c2およびC2c1、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Cpf1、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15

、C s f 1、C s f 2、C s f 3、C s f 4、それらのホモログ、それらのバリエーション、それらの変異体、およびそれらの誘導体が含まれる。3つの主要なタイプのC a sヌクレアーゼ(タイプI、タイプII、およびタイプIII)、ならびに5つのタイプI、3つのタイプII、および2つのタイプIIIタンパク質を含む10のサブタイプがある(例えば、Hochstrasser and Doudna, Trends Biochem Sci, 2015: 40(1): 58-66を参照)。タイプIIのC a sヌクレアーゼには、C a s 1、C a s 2、C s n 2、およびC a s 9が含まれるが、これらに限定されない。これらのC a sヌクレアーゼは当業者によく知られている。例えば、Streptococcus pyogenes野生型C a s 9ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、NBCI Ref. Seq. No. NP269215に記載され、Streptococcus thermophilus野生型C a s 9ポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば、NBCI Ref. Seq. No. WP_011681470に記載されている。C a sヌクレアーゼ、例えばC a s 9ポリペプチドは、いくつかの実施形態では、様々な細菌種に由来する。「C a s 9」は、RNA誘導二本鎖DNA結合ヌクレアーゼタンパク質またはニッカーゼタンパク質を指す。野生型C a s 9ヌクレアーゼは、例えばRuvCおよびHNHである2つの機能ドメインを有し、それらは異なるDNA鎖を切断する。両方の機能ドメインが活性である場合、C a s 9はゲノムDNA(標的DNA)の二本鎖切断を誘導することができる。C a s 9酵素は、いくつかの実施形態では、コリネバクテリウム属、スッテラ属、レジオネラ属、トレポネーマ属、フィリファクター属、ユーバクテリウム属、連鎖球菌属、ラクトバチルス属、マイコプラズマ属、バクテロイデス属、フラビボラ属、フラボバクテリウム属、Sphaerochaeta属、アゾスピリルム属、グルコンアセトバクター属、ナイセリア属、ロゼブリア属、Parvibaculum属、ブドウ球菌属、ニトラチファクター属、およびカンピロバクター属からなる群に属する細菌に由来するC a s 9タンパク質の1つ以上の触媒ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C a s 9は融合タンパク質であり、例えば2つの触媒ドメインは異なる細菌種に由来する。C a s 9ヌクレアーゼの有用なバリエーションには、RuvC⁻もしくはHNH⁻酵素またはニッカーゼなどの単一の不活性触媒ドメインが含まれる。C a s 9ニッカーゼは、1つの活性な機能ドメインのみを有し、いくつかの実施形態では、標的DNAの1つの鎖のみを切断し、それによって一本鎖切断またはニックを生成する。いくつかの実施形態では、少なくともD10A変異を有する変異C a s 9ヌクレアーゼはC a s 9ニッカーゼである。他の実施形態では、少なくともH840A変異を有する変異C a s 9ヌクレアーゼはC a s 9ニッカーゼである。C a s 9ニッカーゼ中に存在する他の変異の例には、限定されないが、N854AおよびN863Aが含まれる。反対のDNA鎖を標的とする少なくとも2つのDNA標的化RNAが使用される場合、C a s 9ニッカーゼを使用して二本鎖切断が導入される。二重ニック誘導二本鎖切断は、NHEJまたはHDRによって修復される。この遺伝子編集戦略は、HDRに有利であり、オフターゲットDNA部位におけるインデル変異の頻度を減少させる。C a s 9ヌクレアーゼまたはニッカーゼは、いくつかの実施形態では、標的細胞または標的生物に対してコドン最適化される。いくつかの実施形態では、C a sヌクレアーゼはRuvC1およびHNHヌクレアーゼドメイン(D10AおよびH840A)の2つのサイレンシング変異を含むC a s 9ポリペプチドであり、dC a s 9と称される。一実施形態では、Streptococcus pyogenes由来のdC a s 9ポリペプチドは、D10位、G12位、G17位、E762位、H840位、N854位、N863位、H982位、H983位、A984位、D986位、A987位、またはそれらの任意の組合せに少なくとも1つの変異を含む。そのようなdC a s 9ポリペプチドおよびそのバリエーションの記載は、例えば国際特許公開第WO2013/176772号に提供されている。dC a s 9酵素は、いくつかの実施形態では、D10、E762、H983、またはD986における変異、ならびにH840またはN863における変異を含む。いくつかの実施例では、dC a s 9酵素はD10AまたはD10N変異を含む。また、dC a s 9酵素は代替的にH840A、H840Y、またはH840Nの変異を含む。いくつかの実施形態では、本発明のdC a s 9酵素

10

20

30

40

50

は、D 1 0 A および H 8 4 0 A ; D 1 0 A および H 8 4 0 Y ; D 1 0 A および H 8 4 0 N ; D 1 0 N および H 8 4 0 A ; D 1 0 N および H 8 4 0 Y ; または D 1 0 N および H 8 4 0 N の置換を含む。置換は、C a s 9 ポリペプチドを触媒的に不活性にし、標的 D N A に結合することができるようにするための代替的に保存的または非保存的置換である。ゲノム編集方法については、C a s ヌクレアーゼは、いくつかの実施形態では、d C a s 9 に連結されたタイプ I I S 制限酵素 F o k 1 の触媒ドメインを含むポリペプチドなどの C a s 9 融合タンパク質を含む。F o k 1 - d C a s 9 融合タンパク質 (f C a s 9) は、二本鎖切断を生成するために標的 D N A の一本鎖に結合するため、2 つのガイド R N A を使用することができる。

【 0 2 1 1 】

10

< 標的配列 >

本明細書の標的配列は、ヌクレアーゼによって認識および切断される核酸配列である。いくつかの実施形態では、標的配列は長さが約 9 ~ 約 1 2 ヌクレオチド、約 1 2 ~ 約 1 8 ヌクレオチド、約 1 8 ~ 約 2 1 ヌクレオチド、約 2 1 ~ 約 4 0 ヌクレオチド、約 4 0 ~ 約 8 0 ヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せの部分的な範囲 (例えば、9 ~ 1 8、9 ~ 2 1、9 ~ 4 0、および 9 ~ 8 0 ヌクレオチド) である。いくつかの実施形態では、標的配列はヌクレアーゼ結合部位を含む。いくつかの実施形態では、標的配列はニック / 切断部位を含む。いくつかの実施形態では、標的配列はプロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) 配列を含む。いくつかの実施形態では、標的核酸配列 (例えば、プロトスペーサー) は 2 0 ヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、標的核酸は 2 0 ヌクレオチド未 20
満である。いくつかの実施形態では、標的核酸は少なくとも 5、1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、3 0 またはそれ以上のヌクレオチドである。標的核酸は、いくつかの実施形態では、最大で 5、1 0、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、3 0 またはそれ以上のヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、P A M の最初のヌクレオチドのすぐ 5 ' 側の 1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、または 2 3 塩基である。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、P A M の最後のヌクレオチドのすぐ 3 ' 側の 1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、または 2 3 塩基である。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、P A M の最初のヌクレオチドのすぐ 5 ' 側の 2 0 塩基である。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、P A M の最後のヌクレオチドのすぐ 3 ' 側の 2 0 塩基 30
である。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は P A M の 5 ' または 3 ' である。標的配列は、いくつかの実施形態では、相補鎖核酸の核酸標的化セグメントが結合する標的核酸中に存在する核酸配列を含む。例えば、標的配列は、いくつかの実施形態では、相補鎖核酸が塩基対を有するように設計される配列を含む。標的配列はヌクレアーゼの切断部位を含む。標的配列は、いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼの切断部位に隣接している。ヌクレアーゼは、いくつかの実施形態では、相補鎖の核酸標的配列が結合する標的核酸中に存在する核酸配列の内側または外側の部位で核酸を切断する。切断部位は、いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼが一本鎖切断または二本鎖切断を生じる核酸の位置を含む。例えば、プロテアーゼ認識配列にハイブリダイズし、プロテアーゼと複合体化した相補鎖核酸を含むヌクレアーゼ複合体の形成は、相補鎖核酸のスペーサー領域が結合する標的核酸中に存在する核酸配列内またはその近傍 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 9、2 0、2 3、5 0、またはそれ以上の塩基対内) の一方または両方の鎖の切断をもたらす。切断部位は、いくつかの実施形態では、核酸の一本鎖のみまたは両方の鎖にある。いくつかの実施形態では、切断部位は核酸の両方の鎖で同じ位置にある (プラント末端を作る) か、または各鎖で異なる部位にある (スタガード末端を作る)。ヌクレアーゼによる標的核酸の部位特異的切断は、いくつかの実施形態では、相補鎖核酸と標的核酸との間の塩基対形成の相補性によって決定される位置で起こる。ヌクレアーゼタンパク質による標的核酸の部位特異的切断は、いくつかの実施形態では、標的核酸中の、プロトスペーサー隣接モチーフ (P A M) と呼ばれる短いモチーフによって決定される位置で起こる。例えば、P A M は認識配列の 3 ' 末端で認識配列の側面に位置する。場合によ 40
50

っては、切断はプラント末端を生成する。場合によっては、切断は5'オーバーハングを有するスタガード末端または粘着末端を生成する。場合によっては、切断は3'オーバーハングを有するスタガード末端または粘着末端を生成する。様々なヌクレアーゼタンパク質のオルソログは異なるPAM配列を利用する。例えば、いくつかの実施形態では、異なるCasタンパク質は異なるPAM配列を認識する。例えば、S.pyogenesでは、PAMは標的核酸中の、配列5'-XRR-3'を含む配列である。式中、RはAまたはGのいずれかであり、Xは任意のヌクレオチドであり、Xはスパーサー配列によって標的化される標的核酸配列のすぐ3'側にある。S.pyogenes Cas9 (SpyCas9)のPAM配列は5'-XGG-3'である。式中、Xは任意のDNAヌクレオチドであり、標的DNAの非相補鎖のヌクレアーゼ認識配列のすぐ3'側にある。Cpf1のPAMは5'-TTX-3'である。式中、Xは任意のDNAヌクレオチドであり、ヌクレアーゼ認識配列のすぐ5'側にある。好ましくは、Cas9/sgRNA複合体は、ゲノム標的配列中のPAM配列の上流3塩基対にDSBを導入し、2つのプラント末端をもたらす。全く同じCas9/sgRNA標的配列が、逆方向でドナーDNA上にロードされる。標的ゲノム遺伝子座ならびにドナーDNAは、Cas9/gRNAによって切断され、直鎖化されたドナーDNAは、NHEJ DSB修復経路を介して標的部位に組み込まれる。ドナーDNAが正しい方向に組み込まれた場合、結合配列はCas9/gRNAによる更なる切断から保護される。ドナーDNAが逆方向に組み込まれた場合、無傷のCas9/gRNA標的部位が存在するため、Cas9/gRNAは組み込まれたドナーDNAを切除する。

10

20

【0212】

本発明の実施形態では、PAMは、TGG、AGG、GGG、CGGから選択される配列を有する。

【0213】

<ベクター>

本発明はまた、本明細書中に記載した核酸構築物を含むベクターに関する。

【0214】

そのようなベクターは、したがって、上記で構築物に関連して記載した任意のエレメントを含有し得る。特に、それは、例えばプロモーター、転写終結配列、翻訳終結配列、エンハンサー、シグナルペプチド、分解シグナルおよびポリアデニル化エレメントなどの、特に上記で定義した1つ以上の調節エレメントを含み得る。

30

【0215】

遺伝子治療のための細胞への核酸の送達および発現に好適なベクターが、本発明に包含される。

【0216】

本発明のベクターには、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターが含まれる。

【0217】

非ウイルスベクターには、核酸を細胞中に導入または維持するために一般的に使用される非ウイルス性薬剤が含まれる。前記薬剤には特に、カチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子(LNP)を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せが含まれる。

40

【0218】

ウイルス送達の中で、アデノ随伴ウイルスなどの遺伝子工学的に操作されたウイルスは、現在、遺伝子送達のための最も一般的なツールの1つである。ウイルスベースの遺伝子送達概念は、目的の遺伝子またはプロモーターおよびイントロンなどの制御配列を発現することができるようにウイルスを操作することである。特定の用途およびウイルスのタイプにもよるが、ほとんどのウイルスベクターは、宿主中で野生型ウイルスとして自由に複製する能力を妨げる変異を含む。いくつかの異なるファミリーのウイルスが、遺伝子送達のためのウイルスベクターを生成するように改変されている。これらのウイルスには、

50

レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、ピコルナウイルス、およびアルファウイルスが含まれる。

【0219】

本発明のウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)などの非病原性パルボウイルス、ガンマレトロウイルス、スプマウイルスおよびレンチウイルスなどのレトロウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルスおよびヘルペスウイルスに由来し得る。

【0220】

本発明による特に好ましいウイルスは、レンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルスである。

【0221】

ウイルスベクターは、本質的に、ウイルス形質導入として知られるプロセスに従って、細胞中に浸透し目的の核酸を細胞中に送達することができる。

【0222】

本明細書で使用される場合、「ウイルスベクター」なる用語は、細胞中への遺伝物質の送達のために操作された、非複製性の非病原性ウイルスを指す。複製および病原性に必須のウイルス遺伝子は、目的の導入遺伝子の発現カセットで置換される。したがって、ウイルスベクターゲノムは、ウイルスベクター産生に必要とされるウイルス配列によって挟まれた導入遺伝子の発現カセットを含む。

【0223】

「ウイルス粒子」または「ウイルスの粒子」という用語は、非病原性ウイルス、特にウイルスベクターの細胞外形態を意味することを意図し、それはDNAまたはRNAのいずれかから作られた遺伝物質が、カプシドと呼ばれるタンパク質の被覆に包まれ、さらに場合によってはウイルス糖タンパク質を含む宿主細胞膜の一部に由来するエンベロープに包まれている。

【0224】

本明細書で使用する場合、ウイルスベクターはウイルスベクター粒子も指す。

【0225】

本発明に包含されるウイルスベクターは、遺伝子治療に好適である。

【0226】

ウイルス粒子は、例えば目的の遺伝子を収容することができるベクターと、ベクター含有感染性ウイルス粒子の生成を可能にするウイルス構造タンパク質および酵素を提供することができるヘルパー細胞を使用して得ることができる。

【0227】

<アデノ随伴ウイルス(AAV)>

アデノ随伴ウイルスは、ヌクレオチド配列、アミノ酸配列、ゲノム構造、病原性、および宿主域が異なるウイルスのファミリーである。この多様性は、異なる生物学的特性を有するウイルスを使用して、様々な治療への応用を開発する機会を提供する。

【0228】

遺伝子送達のための理想的なアデノ随伴ウイルスベースのベクターは、効率的、細胞特異的で、制御され、そして安全でなければならない。送達の効率は、治療の有効性を決定し得る。現在の取り組みは、アデノ随伴ウイルスベクターによる細胞型特異的感染および遺伝子発現の達成を目指している。さらに、治療には長期的または制御された発現が必要とされ得るので、目的の遺伝子の発現を制御するためにアデノ随伴ウイルスベクターが開発されている。

【0229】

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、ヒトおよび一部の他の霊長類に感染する小型のウイルスである。AAVは現在、疾患を引き起こすことが知られておらず、その結果、ウイルスは非常に軽度の免疫応答を引き起こす。AAVを使用する遺伝子治療ベクターは、分裂細胞および静止細胞の両方に感染することができ、宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく、染色体外の状態で持続する。これらの特徴は、遺伝子治療用のウイルスベクターを

10

20

30

40

50

作製するために、および同系のヒト疾患モデルを作製するために、AAVを非常に魅力的な候補にする。

【0230】

野生型AAVは、多くの特徴のために遺伝子治療研究者から多大な関心を集めている。その中でも主要なものは、このウイルスの明らかな病原性の欠如である。それはまた、非分裂細胞にも感染することができ、ヒト第19染色体の特定の部位(AAVS1と呼ばれる)で宿主細胞ゲノムに安定に組み込まれる能力を有する。しかしながら、遺伝子治療ベクターとしてのAAVの開発は、ベクターのDNAからrepおよびcapを除去することによって、この組み込み能力を排除した。所望の遺伝子は、遺伝子の転写を駆動するプロモーターとともに、一本鎖ベクターDNAが宿主細胞DNAポリメラーゼ複合体によって二本鎖DNAに変換された後に、核内でコンカテマー形成を助けるITRの間に挿入される。AAVベースの遺伝子治療ベクターは、宿主細胞の核内でエピソームのコンカテマーを形成する。非分裂細胞では、これらのコンカテマーは宿主細胞の生存期間中、無傷のまま残る。分裂細胞では、エピソームDNAは宿主細胞DNAとともに複製されないため、細胞分裂を通じてAAVDNAは失われる。宿主ゲノムへのAAVDNAのランダムな組み込みは検出可能であるが、非常に低い頻度で起こる。また、AAVは非常に低い免疫原性しか示さず、外見上、中和抗体の発生に限定されており、一方でそれらは明らかに定義される細胞毒性応答を誘導しない。この特徴は、静止細胞に感染する能力とともに、AAVをヒト遺伝子治療に特に適したものにする。

10

【0231】

AAVゲノムは、約4.7キロベース長の一本鎖デオキシリボ核酸(ssDNA)で構築され、それは正鎖または負鎖のいずれかである。ゲノムは、DNA鎖の両末端に逆位末端反復(ITR)を含み、2つのオープンリーディングフレーム(ORF):repおよびcapを含む。前者はAAVのライフサイクルに必要なRepタンパク質をコードする4つの重複遺伝子から構成され、後者はカプシドタンパク質の重複ヌクレオチド配列:VP1、VP2およびVP3を含み、それらは相互作用して正二十面体の対称性のカプシドを形成する。

20

【0232】

逆位末端反復(ITR)配列は、AAVゲノムの効率的な増幅に必要とされることが示されたその対称性のために、その名前がついた。これらの配列の別の特性は、第2DNA鎖のプライマーゼ非依存的合成を可能にする、いわゆるセルフプライミングに寄与するヘアピンを形成する能力である。ITRはまた、完全に結合した、デオキシリボヌクレアーゼ耐性のAAV粒子の生成と組み合わせたAAVDNAの効率的なカプシド形成に必要とされることが示された。

30

【0233】

遺伝子治療に関して、ITRは治療遺伝子の隣に必要とされる唯一のシス配列であるように思われる:構造遺伝子(cap)およびパッケージング遺伝子(rep)はトランスで送達することができる。この仮定を持って、レポーター遺伝子または治療遺伝子を含む組換えAAV(rAAV)ベクターを効率的に産生するための多くの方法が確立された。

【0234】

AAVベクターは、目的の標的細胞を形質導入することができるAAVカプシドを含む。AAVカプシドは、1つ以上の天然または人工のAAV血清型に由来し得る。

40

【0235】

AAVは、それらの血清型によって呼ばれることがある。血清型は、カプシド表面抗原の発現プロファイルによって、他の変異亜種との区別を使用することができる特異的反応性を有するAAVの変異亜種に対応する。通常、特定のAAV血清型を有するAAVベクター粒子は、任意の他のAAV血清型に特異的な中和抗体と効率的に交差反応しない。

【0236】

既知の全ての血清型は、複数の多様な組織型由来の細胞に感染することができる。組織特異性はカプシド血清型によって決定され、それらの向性範囲を変化させるためのAAV

50

ベクターの偽型化は、治療におけるそれらの使用に影響を与える。

【0237】

本発明のAAVベクターシステムで使用される逆位末端反復(ITR)配列は、任意のAAV ITRであり得る。AAVベクターで使用されるITRは、同一であっても異なってもよい。例えば、ベクターは、AAV血清型2のITRおよびAAV血清型5のITRを含み得る。本発明のベクターの一実施形態では、ITRはAAV血清型2、4、5、または8に由来する。本発明ではAAV血清型2のITRが好ましい。AAV ITR配列は当該技術分野でよく知られている(例えば、ITR2については、GenBankアクセッション番号AF043303.1; NC_001401.2; J01901.1; JN898962.1を参照; ITR5については、GenBankアクセッション番号NC_006152.1を参照)。

【0238】

血清型2(AAV2)は、これまでに最も広範に検討されてきた。AAV2は、骨格筋、ニューロン、血管平滑筋細胞および肝細胞に対する自然な向性を示す。

【0239】

AAV2について、3つの細胞受容体が記載されている:ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)、V5インテグリンおよび線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR-1)。最初のもは一次受容体として機能するのに対し、後の2つは共受容体活性を有し、受容体媒介エンドサイトーシスによってAAVが細胞に侵入することを可能にする。HSPGは一次受容体として機能するが、細胞外マトリックス中のその豊富さはAAV粒子を除去し、感染効率を損なう可能性がある。

【0240】

AAV2は様々なAAVベースの研究において最も一般的な血清型であるが、他の血清型が遺伝子送達ベクターとして有効であり得ることが示されている。例えばAAV6は、気道上皮細胞を感染させるのにはるかに優れているように思われ、AAV7は、マウス骨格筋細胞の非常に高い形質導入率を示す(AAV1およびAAV5と同様)。AAV8は肝細胞および視細胞の形質導入に非常に優れており、AAV1および5は血管内皮細胞への遺伝子送達において非常に効率的であることが示された。脳では、ほとんどのAAV血清型がニューロン向性を示すが、AAV5はアストロサイトにも形質導入する。AAV1とAAV2のハイブリッドであるAAV6もまた、AAV2よりも低い免疫原性を示す。

【0241】

血清型は、それらが結合する受容体に関して異なることがある。例えばAAV4およびAAV5の形質導入は、(これらの血清型ごとに異なる形態の)可溶性シアル酸によって阻害することができ、AAV5は血小板由来増殖因子受容体を介して細胞に侵入することが示された。

【0242】

ウイルスおよび異種ポリヌクレオチドまたは構築物を含むビリオンを調製する方法は、当該技術分野で知られている。AAVの場合、細胞は、AAVヘルパー機能に適したアデノウイルス遺伝子を含むアデノウイルスまたはポリヌクレオチド構築物と共感染またはトランスフェクションすることができる。材料および方法の例は、例えば米国特許第8,137,962号および第6,967,018号に記載されている。本発明のAAVウイルスまたはAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、およびAAV11、AAV-PhP.BおよびAAV-PhP.eBの血清型を含むがこれらに限定されない、任意のAAV血清型であり得る。

【0243】

特定の実施形態では、AAV2またはAAV5またはAAV7またはAAV8またはAAV9血清型が利用される。好ましくは、AAV2-8が使用される。

【0244】

好適には、AAVゲノムは、患者への投与の目的で誘導体化される。そのような誘導体

化は当該技術分野で標準的であり、本発明は任意の既知のAAVゲノムの誘導体、および当該技術分野で知られている技術を適用することによって生成することができる誘導体の使用を包含する。AAVゲノムは、任意の天然に存在するAAVの誘導体であり得る。好適には、AAVゲノムはAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、またはAAV11の誘導体である。

【0245】

AAVゲノムの誘導体には、本発明のAAVベクターからの導入遺伝子の*in vivo*での発現を可能にするAAVゲノムの任意の切断または修飾された形態が含まれる。一実施形態では、AAV血清型は、カプシド表面に1つ以上のチロシンからフェニルアラニン(Y-F)への変異を提供する。

10

【0246】

上記で記載したDNA構築物を、本発明のAAVベクターを生成するために使用することができる。AAVベクターは、例えば、プロデューサー細胞、例えばHEK293細胞の三重トランスフェクションによって産生することができ、この方法は、目的の遺伝子を含むプラスミドが、ウイルス粒子が産生されるプロデューサー細胞中に2つの追加のプラスミドとともにトランスフェクションされる当該分野において知られている方法である。

【0247】

<プラスミド>

本明細書中で定義したウイルスベクターの生成のためのプラスミドもまた本発明の範囲内である。

20

【0248】

プラスミドは、上記で記載したDNA構築物を含み得る。プラスミドは通常、細菌中のプラスミドの大規模生産のために通常、必要とされる、細菌複製起点、細菌プロモーター、抗生物質耐性遺伝子などのバックボーンエレメントを更に含む。

【0249】

本発明のベクターの生成のための前記プラスミドの使用は本発明の範囲内である。

【0250】

ベクター、例えばAAVベクターは、例えば、プロデューサー細胞、例えばHEK293細胞の三重トランスフェクションによって産生することができ、この方法は、目的のDNA構築物を含むプラスミドが、ウイルス粒子が産生されるプロデューサー細胞中に2つの追加のプラスミドとともにトランスフェクションされる当該分野において知られている方法である。

30

【0251】

<HITIゲノム編集システム>

本明細書で使用される「ゲノム編集システム」は、好ましくは本発明の構築物またはベクターを使用して、ゲノムを編集するために必要なすべての構成要素を含むシステムである。

【0252】

本発明の範囲内では、ゲノム編集システムは、外来DNA配列およびアルブミン遺伝子の1つ以上のエキソンを任意で含むドナー核酸、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド(例えば、本明細書中に定義したアルブミン遺伝子、好ましくはアルブミン遺伝子のイントロン12、13または14内の標的配列に相同なgRNA)ならびに前記標的配列を認識するヌクレアーゼを含むシステムである。

40

【0253】

好適には、本発明のゲノム編集システムは、本発明のヌクレオチド配列、DNA構築物、ベクター、例えば非ウイルスまたはウイルスベクター、および/またはウイルス粒子を含む。

【0254】

<宿主細胞>

本発明の対象はまた、本発明のウイルスベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は

50

、培養細胞または初代細胞、すなわち生物（例えばヒト）から直接単離された細胞であり得る。宿主細胞は、接着細胞または浮遊細胞、すなわち、懸濁液中で増殖する細胞であり得る。当該技術分野で知られている好適な宿主細胞には、例えば、DH5、大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞などが含まれる。細胞はヒト細胞または他の動物由来であり得る。一実施形態では、細胞は網膜細胞、特に視細胞、RPE細胞または錐体細胞である。細胞はまた、肝細胞、特に肝実質細胞であり得る。適切な宿主の選択は、本明細書の教示から当業者の能力の範囲内であるとみなされる。好ましくは、前記宿主細胞は動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。細胞は、本発明のウイルスベクターに提供されたヌクレオチド配列を発現し得る。

【0255】

10

当業者は、例えばトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ウイルス感染、熱ショック、膜の化学的透過化後の形質転換または細胞融合などの、宿主細胞へのポリヌクレオチドまたはベクターの組み込みの標準的方法を熟知している。

【0256】

本明細書で使用される「宿主細胞または遺伝子操作された宿主細胞」という用語は、本発明のウイルスベクターによって形質導入され、形質転換されまたはトランスフェクションされた宿主細胞に関する。

【0257】

<組成物>

20

本発明の意味の範囲内の医薬組成物は、本発明のシステム、1つ以上のベクター、宿主細胞またはウイルス粒子を薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または補助剤と組み合わせたものを含む。薬学的担体、賦形剤または希釈剤の選択は、意図した投与経路および標準的な薬学的実施に関して選択することができる。医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤としてまたはそれに加えて、ウイルスの標的部位への侵入を補助または増強し得る任意の好適な結合剤、滑沢剤、懸濁化剤、コーティング剤、可溶化剤、および他の担体剤（例えば、脂質送達システムなど）を含み得る。ベクターは*in vivo*または*ex vivo*で投与することができる。

【0258】

本発明の化合物の量を含む、非経口投与に適合した医薬組成物は、好ましい実施形態を構成する。非経口投与では、組成物は、溶液を血液と等張とするのに十分な塩または単糖などの他の物質を含有し得る無菌水性溶液の形態で最もよく使用することができる。好ましい実施形態では、ベクターまたは医薬組成物は、例えば静脈内注射によって全身的に送達される。

30

【0259】

本発明の方法は、ヒトおよび他の動物と共に使用することができる。。本明細書で使用される「患者」および「被験体」という用語は互換的に使用され、そのようなヒトおよび非ヒト種を含むことが意図されている。同様に、本発明の*in vitro*方法は、そのようなヒトおよび非ヒト種の細胞上で行われ得る。

【0260】

40

<キット>

本発明の対象はまた、本発明のDNA構築物、システム、1つ以上のベクター、宿主細胞またはウイルス粒子を1つ以上の容器に含むキットに関する。本発明のキットは、任意で薬学的に許容される担体および/または希釈剤を含み得る。一実施形態では、本発明のキットは、本明細書中に記載されている1つ以上の他の構成要素、添加物、または補助剤を含む。一実施形態では、本発明のキットは、キットのベクターシステムを投与する方法を記載した説明書またはパッケージング材料を含む。キットの容器は、例えばガラス、プラスチック、金属などの任意の好適な材料、および任意の好適なサイズ、形状、または構成であり得る。一実施形態では、本発明のウイルスベクターまたは宿主細胞は、固体としてキット中に提供される。別の実施形態では、本発明のウイルスベクターまたは宿主細胞

50

は、液体または溶液としてキット中に提供される。一実施形態では、キットは、液体または溶液形態の本発明のウイルスベクターまたは宿主細胞を含有するアンプルまたはシリンジを含む。

【0261】

<送達>

本発明のベクターは、患者に投与することができる。前記投与は、「*in vivo*」投与または「*ex vivo*」投与とすることができる。当業者は、適切な投与量を決定することができるであろう。「投与された」という用語は、ウイルスまたは非ウイルス技術による送達を含む。ウイルス送達メカニズムには、上記で記載したアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびバキュロウイルスベクターなどが含まれるが、これらに限定されない。非ウイルス送達システムには、カチオン性ポリマー、ミセル、リポソーム、エクソソーム、微小粒子および脂質ナノ粒子(LNP)を含むナノ粒子などの、ポリマーベース、粒子ベース、脂質ベース、ペプチドベースの送達ビヒクルまたはそれらの組合せ、エレクトロポレーションなどのDNAトランスフェクションが含まれる。本発明によるベクターシステムによる1つ以上の治療遺伝子の送達は、単独で、または他の治療もしくは治療の構成要素と組み合わせて使用することができる。。

10

【0262】

本発明の組成物を送達するための任意の好適な送達方法が考えられる。HITIゲノム編集システムの個々の構成要素(例えば、gRNA、ヌクレアーゼおよび/または外来DNA配列)は、いくつかの実施形態では、同時にまたは時間的に分離して送達される。遺伝子修飾の方法の選択は、形質転換される細胞の種類および/または形質転換が行われる状況(例えば、*in vitro*、*ex vivo*、または*in vivo*)に依存する。これらの方法の一般的な説明は、Ausubel, et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995に見出される。

20

【0263】

「細胞と接触させること」という用語は、本明細書で開示した全ての送達方法を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で開示した方法は、標的DNAに接触させること、または相補鎖核酸(例えば、gRNA)、部位特異的修飾ポリペプチド(例えば、Castaンパク質)もしくはそれをコードする核酸をコードするヌクレオチド配列および/または外来DNA配列を含む1つ以上の核酸を細胞(または細胞集団)に導入することを含む。

30

【0264】

<ゲノムDNA編集の方法>

「ゲノム編集」という用語は、1つ以上のヌクレアーゼおよび/またはニッカーゼを使用して、標的DNA、例えば細胞のゲノムに、DNAを挿入し、置換し、または除去する遺伝子工学の一種を指す。

【0265】

本明細書では、分裂細胞または非分裂細胞または最終分化細胞のゲノムDNAを含むゲノムDNAなどの核酸に変更を加えるための相同性非依存性標的組込み(HITI)の方法および組成物が提供される。本明細書の方法は、少なくともいくつかの実施形態では、相同性に依存しないで、非相同末端結合を使用して、外来DNAを標的DNA(例えば分裂または非分裂または最終分化細胞などの細胞のゲノムDNA)に挿入する。いくつかの実施形態では、本明細書の方法は、非分裂細胞を、外来DNA配列および標的配列を含む1つ以上の標的化構築物、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド、およびヌクレアーゼを含む組成物と接触させることを含む、分裂または非分裂細胞のゲノム中に外来DNA配列を組み込む方法を含む。ここで、外来DNA配列はゲノムと比較して少なくとも1つのヌクレオチドの差異を含み、標的配列はヌクレアーゼによって認識される。本明細書に開示されるHITI方法のいくつかの実施形態では、外来DNA配列は、標的細胞または宿主細胞のゲノムに挿入されるべき所望の配列を含むDNA断片である。外来DNA配

40

50

列の少なくとも一部は、標的細胞または宿主細胞のゲノムの一部に相同な配列を有し、外来DNA配列の少なくとも一部は、標的細胞または宿主細胞のゲノムの一部に相同でない配列を有する。例えば、いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、その中に変異を有する宿主細胞ゲノムDNA配列の一部を含み得る。したがって、外来DNA配列が宿主細胞または標的細胞のゲノムに組み込まれる場合、外来DNA配列中に見出された変異は、宿主細胞または標的細胞ゲノムに運ばれる。本明細書に開示されるHITI方法のいくつかの実施形態では、外来DNA配列は、少なくとも1つの標的配列に隣接する。いくつかの実施形態では、外来DNA配列は、2つの標的配列に隣接する。標的配列は、少なくとも1つのヌクレアーゼによって認識される特異的DNA配列を含む。いくつかの実施形態では、標的配列は、標的配列に相同な配列を有する相補鎖オリゴヌクレオチドの存在下でヌクレアーゼによって認識される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるHITI方法において、標的配列は、ヌクレアーゼによって認識および切断されるヌクレオチド配列を含む。標的配列を認識するヌクレアーゼは当業者によって知られており、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、およびクラスター化された規則的な間隔の短い回文繰り返し(CRISPR)ヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。ZFNは、いくつかの実施形態では、亜鉛フィンガーDNA結合ドメインおよびDNA切断ドメインを含み、それらは配列特異的ヌクレアーゼを作るために融合されている。TALENは、いくつかの実施形態では、TALEエフェクターDNA結合ドメインおよびDNA切断ドメインを含み、それらは配列特異的ヌクレアーゼを作るために融合されている。CRISPRヌクレアーゼは、いくつかの実施形態では、原核生物のDNAに一般的に見出される、クラスター化された規則的な間隔の短い回文繰り返しに相同なDNA配列を認識する天然に存在するヌクレアーゼである。CRISPRヌクレアーゼには、Cas9、Cpf1、C2c3、C2c2、およびC2c1が含まれるが、これらに限定されない。好都合には、本発明のCas9は、オフターゲット活性が減少した変異体であるSpCas9D10A(Ran, F. A., et al., Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc, 2013. 8(11): p. 2281-2308.) (RuvCドメイン切断活性の不活性化を伴う); SpCas9N863A(Ran, F. A., et al., Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc, 2013. 8(11): p. 2281-2308) (HNHドメイン切断活性の不活性化); SpCas9-HF1(Kleinsteiner, B. P., et al., High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature, 2016. 529(7587): p. 490-5) (タンパク質工学によるCas9結合エネルギーの減少); eSpCas9(laymaker, I. M., et al., Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science, 2016. 351(6268): p. 84-8) (Cas9の正電荷の減少); EvoCas9(asini, A., et al., A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. Nat Biotechnol, 2018. 36(3): p. 265-271) (REC3ドメインの突然変異誘発); KamiCas9(Merienne, N., et al., The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes. Cell Rep, 2017. 20(12): p. 2980-2991) (発現後のCas9のロックアウト)である。

本明細書に開示されるHITI DNAゲノム編集法は、いくつかの実施形態では、宿主ゲノムまたは標的ゲノムに外来DNA配列を導入することができる。いくつかの実施形態

では、挿入は、1～4700塩基対、例えば1～10、5～20、15～30、20～50、40～80、50～100、100～1000、500～2000、1000～4700塩基対の範囲の特定のヌクレオチド数を含む。いくつかの実施形態では、該方法は、宿主ゲノムまたは標的ゲノムから少なくとも1つの遺伝子、またはその断片、例えば、1つ以上のエキソンまたはそれらの断片を除去することを含む。いくつかの実施形態では、該方法は、外来遺伝子（また本明細書では外来DNA配列または目的の遺伝子としても定義される）またはその断片を宿主ゲノムまたは標的ゲノムに導入することを含む。本明細書に開示されるHITIゲノム編集法は、分裂細胞および非分裂細胞中のゲノムDNAに変更を加える能力が増大している。非分裂細胞は、これらに限定されないが、以下を含む：ニューロン、オリゴデンドロサイト、ミクログリアおよび上皮細胞を含む中枢神経系の細胞；感覚伝達細胞；自律神経細胞；感覚器および末梢神経支持細胞；光受容体、桿体および錐体を含む網膜の細胞；壁細胞、糸球体足細胞、近位尿細管刷子縁細胞、ヘンレループ細管細胞、遠位尿細管細胞、集合管細胞を含む腎臓の細胞；リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、血小板を含む造血系細胞。本発明の好ましい非分裂細胞は、肝実質細胞、星状細胞、クッパー細胞および肝内皮細胞を含む肝細胞であり、好ましくは肝実質細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるHITIゲノム編集法は、分裂細胞中のゲノムDNAに変更を加える方法を提供し、該方法は、当該技術分野で開示された従来の方法よりも高い効率を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるHITI方法のためのドナー核酸、相補鎖オリゴヌクレオチド、および/またはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、ウイルスによって標的細胞または宿主細胞に導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスは標的細胞に感染し、標的化構築物、相補鎖オリゴヌクレオチド、およびヌクレアーゼを発現し、標的化構築物の外来DNAが宿主ゲノムに組み込まれることを可能にする。いくつかの実施形態では、ウイルスは、センダイウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、パキユロウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスは偽型ウイルスである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるHITI方法のためのドナー核酸、相補鎖オリゴヌクレオチド、および/またはヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドは、非ウイルス性遺伝子送達法によって標的細胞または宿主細胞に導入される。非ウイルス性遺伝子送達法は、いくつかの実施形態では、標的細胞中に遺伝物質（DNA、RNAおよびタンパク質を含む）を送達し、ドナー核酸、相補鎖オリゴヌクレオチド、およびヌクレアーゼを発現し、ドナー核酸の外来DNAが宿主ゲノムに組み込まれることを可能にする。いくつかの実施形態では、非ウイルス法は、DNA、mRNAまたはタンパク質のためのトランスフェクション試薬（ナノ粒子を含む）、またはエレクトロポレーションを含む。

【0266】

< 疾患を治療する方法 >

また本明細書では、遺伝性疾患などの疾患を治療するための方法および組成物も提供される。遺伝性疾患は、遺伝性DNAの変異によって引き起こされる疾患である。いくつかの実施形態では、遺伝性疾患はゲノムDNAの変異によって引き起こされる。遺伝子変異は当業者によって知られており、一塩基対の変化または点変異、挿入、および欠失を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法は、それを必要とする被験体における遺伝性疾患を治療する方法を含み、該遺伝性疾患は、野生型遺伝子と比較して少なくとも1つの変化したヌクレオチドを有する変異遺伝子に起因し、該方法は、被験体の少なくとも1つの細胞を、DNA構築物、ベクター（例えば非ウイルスもしくはウイルスベクター）を含む組成物、または外来DNA配列および任意にアルブミン遺伝子の1つ以上のエキソンを含むドナー核酸、標的配列に相同な相補鎖オリゴヌクレオチド（例えば標的配列に相同なgRNA）、および前記標的配列を認識するヌクレアーゼが前記細胞中に導入される本発明によるシステムと接触させることを含み、前記標的配列は、前記アルブミン遺伝子のイントロン9、イントロン11、イントロン12、イントロン13およびイントロン14から選択される領域のアルブミン遺伝子の3'末端に位置する。次いで、ドナー

DNAは、NHEJによって標的遺伝子座に挿入され、アルブミン遺伝子が再構成され、治療遺伝子がアルブミンプロモーターの制御下で、標的細胞中で発現される。

【0267】

本明細書に開示される方法によって治療される遺伝性疾患には、ムコ多糖症(MPS I、MPS II、MPS IIIA、MPS IIIB、MPS IIC、MPS IVA、MPS IVB、MPS VI)を含むリソソーム蓄積症、スフィンゴ脂質症(ファブリー病、ゴーシェ病、ニーマンピック病、GM1ガングリオシドーシス)、リポフスチン症(バツテン病および他のもの)およびムコリピドーシス; 肝臓を治療用タンパク質の産生および/または分泌の工場として使用することができる他の疾患、例えば糖尿病、脳回状脈絡網膜萎縮症、アデニロコハク酸欠損症、血友病AおよびB、ALA脱水素酵素欠損症、副腎白質ジストロフィーが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0268】

「ゲノム編集」という用語は、1つ以上のヌクレアーゼおよび/またはニッカーゼを使用して、標的DNA、例えば細胞のゲノムに、DNAを挿入し、置換し、または除去する遺伝子工学の一種を指す。

【0269】

「非相同末端結合」または「NHEJ」という用語は、相同な鋳型を必要とせずに、切断末端が直接連結される二本鎖DNA切断を修復する経路を指す。

【0270】

「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」、「ヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は互換的に使用することができ、一本鎖、二本鎖または多本鎖形態のデオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)およびそれらのポリマーを指す。この用語には、一本鎖、二本鎖もしくは多本鎖DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリンおよび/またはピリミジン塩基、または他の天然の塩基、化学修飾塩基、生化学修飾塩基、非天然塩基、合成塩基、もしくは誘導体化塩基を含むポリマーが含まれるが、これらに限定されない。それはまた、メチル化および/またはキャッピングなどの修飾、ならびにポリヌクレオチドの非修飾形態を含む。より具体的には、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」という用語は、ポリデオキシリボヌクレオチド(2-デオキシ-D-リボースを含む)、ポリリボヌクレオチド(D-リボースを含む)、任意の他のタイプのポリヌクレオチド(プリンまたはピリミジン塩基のN-もしくはC-グリコシド、および非ヌクレオチド性主鎖、例えばポリアミド(例えば、ペプチド核酸(PNA))およびポリモルホリン(Anti-Virals, Inc.、コーパリス、オレゴンがNiugeneとして市販している)ポリマー、ならびに他の合成配列特異的核酸ポリマー(ポリマーにはDNAとRNAに見られるような塩基対形成および塩基スタッキングを可能にする構成で核酸塩基が含まれている)を含む。いくつかの実施形態では、核酸は、DNAおよびRNAならびにそれらの類似体の混合物を含み得る。特に限定されない限り、該用語は、参照核酸と同様の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと同様の形で代謝される既知の天然ヌクレオチドの類似体を含む核酸を包含する。別段の指示がない限り、また特定のヌクレオチド配列は、保存的に修飾されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、一塩基多型(SNP)、および相補配列ならびに明示的に示された配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された(または全ての)コドンの3位が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することによって達成することができる。核酸という用語は、遺伝子、cDNAおよび遺伝子によってコードされるmRNAと互換的に使用される。「遺伝子」または「ポリペプチドをコードする核酸配列」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に關与するDNAのセグメントを意味する。DNAセグメントは、遺伝子産物の転写/翻訳および転写/翻訳の調節に關与するコード領域の前後の領域(リーダーおよびトレーラー)、ならびに個々のコードセグメント(エキソン)の間の介在配列(イントロン)を含み得る。

20

30

40

【0271】

50

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。これらの用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマー、および非天然アミノ酸ポリマーに適用される。本明細書で使用される場合、これらの用語は、アミノ酸残基が共有ペプチド結合によって連結されている全長タンパク質を含む、任意の長さのアミノ酸鎖を包含する。

【0272】

「組換え発現ベクター」は、宿主細胞中の特定のポリヌクレオチド配列の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換えまたは合成によって生成された核酸構築物である。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスゲノム、または核酸断片の一部であり得る。通常、発現ベクターは、プロモーターと作動可能に連結された、転写されるべきポリヌクレオチドを含む。

10

【0273】

本明細書で使用される場合、「投与する」という用語は、対象への経口投与、局所接触、坐剤としての投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、病巣内投与、髄腔内投与、経鼻投与、または皮下投与を含む。投与は、非経口および経粘膜（例えば、頬、舌下、口蓋、歯肉、鼻腔、膣、直腸、または経皮）を含む、任意の経路による。非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、真皮内、皮下、腹腔内、心室内、および頭蓋内が含まれる。他の送達様式には、リポソーム製剤、静脈内注入、経皮パッチなどの使用が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0274】

「治療する」という用語は、治療上の利益および/または予防上の利益を含むが、これらに限定されない、有益または所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療上の利益とは、治療下の1つ以上の疾患、状態、または症状における任意の治療上関連する改善または効果を意味する。疾患の進行を遅らせることは、本発明の意味の範囲内で治療上の改善とみなされる。予防上の利益のために、当該組成物は、特定の疾患、状態、または症状を発症するリスクのある被験体、または疾患、状態、または症状がまだ顕在化していない可能性があっても、疾患の生理学的症状の1つ以上を報告する被験体に投与することができる。「有効量」または「十分量」という用語は、有益または所望の結果をもたらすのに十分な薬剤（例えば、DNAヌクレアーゼなど）の量を指す。治療上の有効量は、治療されている被験体および疾患状態、被験体の体重および年齢、疾患状態の重症度、投与様式などの1つ以上に応じて変動し得、当業者が容易に決定し得る。特定の量は、選択された特定の薬剤、標的細胞の種類、被験体内の標的細胞の位置、従うべき投与計画、それが他の化合物と組み合わせて投与されるか否か、投与のタイミング、およびそれが運ばれる物理的送達システムの1つ以上に応じて変動し得る。

30

【0275】

「薬学的に許容される担体」という用語は、薬剤（例えば、DNAヌクレアーゼなど）を細胞、生物、または被験体に投与するのを補助する物質を指す。「薬学的に許容される担体」とは、組成物または製剤中に含めることができ、患者に重大な有害な毒性効果を引き起こさない担体または賦形剤を指す。薬学的に許容される担体の非限定的な例としては、水、NaCl、通常の生理食塩水、乳酸リンゲル液、通常のショ糖、通常のブドウ糖、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、甘味剤、香料および着色料などが挙げられる。当業者は、他の薬学的担体が本発明において有用であることを認識するであろう。

40

【0276】

< 変異体、誘導體、類似体、および断片 >

本明細書に記載した特定のタンパク質および核酸に加えて、本発明はまた、それらの変異体、誘導體、および断片も包含する。

【0277】

本発明の文脈において、任意の与えられた配列の「変異体」は、問題のポリペプチドま

50

たはポリヌクレオチドがその内因性機能の少なくとも1つを保持するように、残基（アミノ酸残基または核酸残基のいずれか）の特異的配列が修飾された配列である。変異体配列は、天然に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドに存在する少なくとも1つの残基の付加、欠失、置き換え、修飾、置換および/または変化によって得ることができる。

【0278】

本発明のタンパク質またはポリペプチドに関して、本明細書で使用される「誘導體」という用語は、得られるタンパク質またはポリペプチドがその内因性機能の少なくとも1つを保持する限り、その配列からの1つの（または1を超える）アミノ酸残基の任意の置換、変化、修飾、置き換え、欠失および/または付加を含む。

【0279】

通常、アミノ酸置換は、例えば1、2または3から10または20までの置換が、改変された配列が要求される活性または能力を保持する限りにおいて行われ得る。アミノ酸置換は、非天然に存在する類似体の使用を含み得る。

【0280】

また本発明で使用されるタンパク質は、アミノ酸残基の欠失、挿入または置換を有することがあり、それはサイレントチェンジを生じ、機能的に等価なタンパク質となる。意図的なアミノ酸置換は、内因性機能が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づいて行われ得る。例えば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる；正に荷電したアミノ酸にはリシンおよびアルギニンが含まれる；および類似の親水性値を有する無電荷極性頭部基を有するアミノ酸には、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンおよびチロシンが含まれる。

【0281】

保存的置換は、例えば以下の表に従って行われ得る。第2列の同じブロック内および第3列の同じ行内のアミノ酸は、互いに置換することができる。

【0282】

【表2】

脂肪族	非極性	G A P
		I L V
	極性 - 無電荷	C S T M
		N Q
		D E
極性 - 電荷	K R H	
	F W Y	
芳香族		

【0283】

通常、変異体は、野生型アミノ酸配列または野生型ヌクレオチド配列と一定の同一性を有し得る。

【0284】

本明細書において、変異体配列は、対象の配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%または90%の同一性、好適には少なくとも95%、96%または97%または98%または99%の同一性を有し得るアミノ酸配列を含むとされる。変異体は類似性の観点からも考慮することができるが（すなわち、類似の化学的性質/機能を有するアミノ酸残基）、本発明の文脈では配列同一性で表現することが好ましい。

【0285】

本明細書において、変異体配列は、対象の配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%または90%の同一性、好適には少なくとも95%、96%または97%または98%または99%の同一性を有し得るヌクレオチド配列を含むとされる。変異体は類似性の観点からも考慮することができるが、本発明の文脈では配列同一性で表現する

10

20

30

40

50

ことが好ましい。

【0286】

好適には、本明細書に詳述されている配列番号のいずれか1つと所定のパーセントの同一性を有する配列への言及は、言及される配列番号の全長にわたって記載されたパーセントの同一性を有する配列を指す。

【0287】

配列同一性の比較は、目視で、またはより一般的には、容易に入手可能な配列比較プログラムの助けを借りて行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の同一性パーセントを計算することができる。

【0288】

同一性パーセントは、連続する配列にわたって計算することができる。すなわち、一方の配列を他方の配列とアラインメントし、一方の配列の各アミノ酸または各ヌクレオチドが他方の配列の対応するアミノ酸またはヌクレオチドと、一度に1残基ずつ直接比較される。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。通常、そのようなギャップなしアラインメントは、比較的少数の残基に対してのみ行われる。

【0289】

これは非常に単純で一貫した方法であるが、例えば他の面では、同一の配列のペアにおいて、アミノ酸またはヌクレオチド配列の1つの挿入または欠失があると、それに続く残基またはコドンが整列しなくなる可能性があり、その結果、グローバルアライメントを実行すると、同一性の割合が大幅に減少する可能性を考慮していない。その結果、ほとんどの配列比較方法は、全体的な同一性スコアに過度のペナルティを与えることなく、挿入および欠失の可能性を考慮した最適なアライメントを生成するように設計されている。これは、配列アラインメント中に「ギャップ」を挿入して、局所的な同一性を最大化しようとすることによって達成される。

【0290】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、アラインメントで生じる各ギャップに「ギャップペナルティ」が割り当てられ、同じ数の同一のアミノ酸またはヌクレオチドについて、可能な限り少数のギャップを有する配列アラインメントが、比較された2つの配列間のより高い関連性を反映して多数のギャップを有するものよりも高いスコアを達成する。「アフィンギャップコスト」は、ギャップの存在に対して比較的高いコストを、ギャップの後続の各残基に対しては比較的低いペナルティを課すものであり、通常、使用されている。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然、より少数のギャップを有する最適化されたアラインメントとなるであろう。ほとんどのアラインメントプログラムでは、ギャップペナルティを修正することができる。しかしながら、そのようなソフトウェアを使用して配列比較を行う場合、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG WisconsinのBestfitパッケージを使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトギャップペナルティは、ギャップ1個に対して-12であり、1個伸長するごとに-4である。

【0291】

したがって、最大パーセント同一性の計算は、まずギャップペナルティを考慮に入れた最適アラインメントの生成を必要とする。そのようなアラインメントを実行するための好適なコンピュータプログラムは、GCG WisconsinのBestfitパッケージ(米国、ウィスコンシン大学; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12:387)である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ(Ausubel et al. (1999) ibid - Ch. 18を参照)、FASTA(Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410)、EMBOSS Needle(Madeira, F., et al., 2019. Nucleic acids research, 47(W1), pp. W636-W641)およびGENEWORKS比較ツール群が含まれるが、これらに限定されない。BLASTとFASTAの両者は

10

20

30

40

50

、オフライン検索およびオンライン検索に利用可能である (Ausubel et al. (1999) *ibid*; 7-58~7-60頁を参照)。しかしながら、いくつかの用途では、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。別のツールであるBLAST 2 Sequencesもまた、タンパク質および核酸配列の比較に利用可能である (FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174(2): 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177(1): 187-8)。

【0292】

最終的な同一性のパーセントは測定することができるが、アラインメントプロセス自体は通常、全か無かという対の比較に基づくものではない。代わりに、化学的類似性または進化的距離に基づいて各対の比較にスコアを割り当てるスケールされた類似性スコアマトリックスが一般的に使用される。一般的に使用されるそのようなマトリックスの一例は、BLOSUM62マトリックス(BLASTプログラム群のデフォルトマトリックス)である。GCG Wisconsinプログラムは、一般的に、公的なデフォルト値または提供された場合はカスタムシンボル比較表のいずれかを使用する(詳細については、ユーザーマニュアルを参照)。いくつかの用途では、GCGパッケージ用に公的なデフォルト値、または他のソフトウェアの場合はBLOSUM62などのデフォルトマトリックスを使用することが好ましい。

10

【0293】

ソフトウェアがひとたび最適なアラインメントを生成すると、配列同一性パーセントを計算することが可能である。ソフトウェアは通常、配列比較の一部としてこれを行い、数値の結果を出す。配列同一性パーセントは、言及される配列番号中の総残基数に対するパーセンテージとしての同一残基数として計算することができる。

20

【0294】

「断片」もまた変異体であり、該用語は通常、機能的に、または例えばアッセイにおいて、目的のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの選択された領域を指す。「断片」は、したがって、全長ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸または核酸配列を指す。

【0295】

そのような変異体、誘導体、および断片は、部位特異的変異誘発などの標準的な組換えDNA技術を使用して調製することができる。挿入が行われるべき場合、挿入部位の両側にある天然に存在する配列に対応する5'と3'の隣接領域とともに、挿入をコードする合成DNAを作製することができる。隣接領域は、天然に存在する配列中の部位に対応する便利な制限部位を含有しているので、配列は適切な酵素で切断され、合成DNAをその切断部位に連結することができる。次いで、本発明に従ってDNAを発現させ、コードされたタンパク質を作製する。これらの方法は、DNA配列の操作のための多数の標準技術のうち例示的なものに過ぎず、他の公知の技術もまた使用することができる。

30

【0296】

本発明は、以下の実施例によって例示される。

【実施例】

40

【0297】

<材料および方法>

<Cas9鑄型として使用されるプラスミド>

AAVベクター産生に使用されるプラスミドは、AAV血清型2の逆位末端反復を含むpAAV2.1プラスミドに由来する。

【0298】

AAV-SpCas9を生成するために必要なAAVベクタープラスミドは、ハイブリッド肝臓プロモーター(HLP)および合成pA配列を含む。

【0299】

AAV-gRNA-donorDsRedを生成するために必要なAAVベクタープラ

50

スミドは、U6プロモーター、特異的なgRNAおよびPAM配列、およびキメラgRNA足場；スプライシングアクセプターシグナル、mAlbのエキソン14、T2Aリンカー、DsRedコード配列[CDS(NCBI ref. MK301207.1)]、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、ウシ成長ホルモンポリA(BGHポリA)、および逆位gRNAおよびPAM配列によって囲まれた停止コドンを含む。

【0300】

AAV-gRNA-donorARSBを生成するために必要なAAVベクタープラスミドは、U6プロモーター、特異的なgRNAおよびPAM配列、およびキメラgRNA足場；スプライシングアクセプターシグナル、mAlbのエキソン14、T2Aリンカー、ヒトARSB CDS(NCBI ref. NM_000046.5)、BGHポリA、および逆位gRNAおよびPAM配列によって囲まれた停止コドンを含む。

10

【0301】

AAV-gRNA-Cas9を生成するために必要なAAVベクタープラスミドは、U6プロモーター、特異的なgRNA、およびキメラgRNA足場；ハイブリッド肝臓プロモーター(HLP)、spCas9および合成pA配列を含む。

【0302】

AAV-donorFVIIIIを生成するために必要なAAVベクタープラスミドは、スプライシングアクセプターシグナル、mAlbのエキソン14、T2Aリンカー、ヒトFVIIII Bドメイン欠失コドン最適化配列([33]に公開)、BGHポリA、および逆位gRNAおよびPAM配列によって囲まれた停止コドンを含む。

20

【0303】

マウスアルブミン(mAlb)gRNA(表1、3)は、mAlbのイントロン13またはヒトアルブミン(hALB)のイントロン12、13もしくは14を標的とする、予測されるオンターゲットおよびオフターゲットスコアが最良のgRNAを選択して、Benchmarking gRNA設計ツール(www.benchmarking.com)を使用して設計した。スクランブルgRNAは、マウスゲノム中のどの配列ともアラインメントしないように設計した。

【0304】

<AAVベクターの産生および特性評価>

AAVベクターは、TIGEM AAVベクターコアにより、HEK293細胞のトリプルトランスフェクションに続く2回のCsCl₂精製によって産生された[34]。各ウイルス調製物について、物理的力価(GC/mL)は、ドットプロット分析[39]およびTaqMan(Applied Biosystems、カールズバッド、CA、USA)を使用したPCR定量[34]によって達成された力価を平均化することによって決定した。ドットプロットおよびPCR分析に使用されるプローブは、pAAV2.1-IRBP-SpCas9-spAベクターについてはIRBPプロモーター、pAAV2.1-HLP-SpCas9-spAベクターについてはHLPプロモーター、ドナーDNAベクターについてはbGHPA領域とアニーリングするように設計した。プローブの長さは200~700bpの間で変動した。

30

40

【0305】

<HEK293細胞の培養およびトランスフェクション>

HEK293細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)および2mM L-グルタミン(Gibco、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA)を含むDMEMで維持した。細胞は6ウェルプレート(1x10⁶細胞/ウェル)に播種し、16時間後にCas9および種々のgRNAおよびドナーDNAをコードするプラスミドでリン酸カルシウム法(1~2μg/1x10⁶細胞)を用いてトランスフェクションした；培地は4時間後に交換した。トランスフェクションされた最大の材料は3μgであった。全ての場合において、プラスミドDNAの量は、必要に応じて空のベクターを使用して、ウェル間で均一化した。

50

【0306】

<フローサイトメトリー分析>

6ウェルプレートに播種したHEK293細胞を、PBSで1回洗浄し、トリプシン0.05% EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) で剥離し、PBSで2回洗浄し、PBS、5% FBSおよび2.5 mM EDTAを含むソーティング溶液に再懸濁した。細胞は、EGFPおよびDsRedに対して適切な励起および検出設定を使用して、BD FACSDivaソフトウェア (BD Biosciences) を備えたBD FACSAria III (BD Biosciences, サンノゼ, CA, USA) 上で分析した。蛍光検出のための閾値は、トランスフェクションされていない細胞で設定し、サンプルあたり最小10,000個の細胞を分析した。サンプルあたり最小50,000個のGFP+細胞またはGFP+/DsRed+細胞をソーティングし、DNA抽出に使用した。

10

【0307】

<マウス肝臓凍結切片および蛍光画像>

HITIの後の肝臓におけるDsRedの発現を評価するために、C57BL/6マウスをp1で注射し、注射1ヶ月後に心臓灌流によって殺した。各肝葉の小片を解剖し、一晚4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定後、小片をO.C.T.マトリックス (Kalttek, パドア, イタリア) に包埋する前に、15%ショ糖で1日および30%ショ糖で一晚浸潤し、凍結切片とした。肝臓凍結切片を6μmの厚さで切断し、スライド上に分配し、DAPI (Vector Lab, ピーターバラ, UK, #H-1200) を補充したVectashieldでマウントした。次いで、凍結切片を、適切な励起および検出設定を使用して、共焦点顕微鏡LSM 700 (Leica Microsystems, ウェツラー, Germany) 下で、20倍で分析した。

20

【0308】

<組込み結合の特性評価>

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, ヒルデン, ドイツ) を使用して、製造者のプロトコールに従って肝組織からDNAを抽出した。

【0309】

T7切断アッセイのために、マウスAlbイントロン13中のCas9標的部位を含む領域を、特異的プライマー (表2) を使用してPCR増幅するために100ngのDNAを使用した。このプライマーは652bpのPCR産物を生成する。PCR産物を、製造者の推奨に従ってT7エンドヌクラーゼIアッセイによって検査した。簡潔には、DNAを、サーモサイクラー中でNEBuffer 2 (New England Biolabs, イプスウィッチ, MA, USA) を用いて穏やかな温度勾配によって脱アニーリングと再アニーリングした。次いで、サンプルを37°Cで30分間1μLのT7エンドヌクラーゼ (NEB, #M0302L) とインキュベートし、2%アガロースゲルで分析した。PCR産物はまた、サンガーシーケンシング (Eurofins Genomics, エーバースベルク, ドイツ) のために使用し、次いでSYNTHEGOソフトウェア (<https://ice.synthego.com/#/>) を使用して処理し、インデル頻度を解析した。

30

40

【0310】

3'マウスアルブミン遺伝子座 (イントロン13の末端) へのドナーの組込みを検出するために、特異的プライマー (表2) を使用してHITI結合のPCR増幅のために抽出したDNAの100ngを使用した。PCR産物を2%アガロースゲルで分析し、さらにPCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, カールズバッド, CA, USA) 中でクローニングした。次いで、単一クローンを使用して、ドナーの組込みを特性評価するためのサンガーシーケンシング (Eurofins Genomics, エーバースベルク, ドイツ) を行った。

【0311】

<血漿採取およびF8アッセイ>

50

1部の緩衝化クエン酸三ナトリウム0.109M(5T31.363048; BD、Franklin Lakes、NJ、USA)に、9部の血液を眼窩後方から採取した。血漿サンプルを15分間4 で、3000rpmで遠心分離した後に採取した。

【0312】

F8活性を評価するために、製造者の指示に従って、Coatest(商標)SP4 FVIII-kit(K824094; Chromogenix、Werfen、ミラノ、イタリア)を使用して血漿サンプルで発色アッセイを行った。標準曲線は、市販のヒトF8(Refecto、Pfizer)の連続希釈によって作成した。結果はデシリットル(dL)あたりの国際単位(IU)として発現される。

【0313】

<結果>

[実施例1]

新生児野生型マウスにおけるマウス3'Alb(mAlb)遺伝子座へのHITI媒介DsRed組込み

発明者らは、概念実証として、野生型新生児マウスのmAlb遺伝子座3'にレポーターDsRed導入遺伝子をノックインするためのin vivo実験を行った(図1A)。この目的のために、以下の3種類の異なるAAV8ベクターを生成した:ハイブリッド肝臓プロモーター(HLP)の発現下でSpCas9をコードする1つのベクター;HITドナーDsRedコード配列(CDS)を含むベクター;およびU6-gRNAまたはU6-scRNA発現カセットのいずれかを含むベクター。具体的には、ドナーDNAカセットには、合成スプライシングアクセプターシグナル(SAS)、最後のアルブミンエクソン(ex14)、およびDsRedのコード配列とそれに続くT2A配列が含まれる。配列を以下に示す。

【0314】

野生型(WT)C57BL/6マウスを2つの異なる処理群(gRNAまたはscRNA)に分け、生後1日目(p1)に側頭静脈を介して1:1の比率でベクターの混合物を投与した。3'mAlb遺伝子座にDsRed CDSを組み込むために、gRNA群には、U6プロモーターおよびgRNA配列とともにSpCas9をコードするベクターと、HITドナーを運ぶベクターを注射した。陰性対照として、scRNA群は同じ実験スキームに従って処理したが、HITドナーを運ぶベクターにはU6-scRNA発現カセットが含まれていた。SpCas9の切断効率を評価し、特異的プライマー(表2)を使用して組込み結合をPCR増幅するために、注射後4週間で動物を殺し、肝サンプルからDNAを抽出した。予想通り、SpCas9の切断はgRNA処理動物でのみ起こり、scRNA群では起こらなかった(図1B)。さらに、PCR分析は、gRNA処理動物における標的部位での5'と3'結合産物を示したが、scRNA処理動物では示さなかった(図1C)。これらの結果と一致して、肝臓凍結切片の顕微鏡画像から、DsRedがgRNA処理動物で高発現しているが、scRNA処理対照では全く存在しないことが明らかになった(図1D)。これらのデータ全てを合わせると、HITIは3'mAlb遺伝子座へのDsRedの組込みと発現に適したプラットフォームであることが示された。

【0315】

[実施例2]

新生児MPSVIマウスにおけるHITI媒介ARSB送達

次に、発明者らは、新生児マウスの3'mAlb遺伝子座におけるHITIによって、リソソーム蓄積症ムコ多糖症VI型(MPS VI)で欠損しているリソソーム加水分解酵素アシルスルファターゼB(ARSB)のレベルが安定的し、治療的に適切なレベルとなるかを検証した。ARSBは血流中に分泌され、非侵襲的に測定することができるので、肝臓の形質導入の指標として使用することができる[35]。ARSB欠損症は、異常なグリコサミノグリカン(GAG)の蓄積および尿中分泌をもたらし、これはMPS VIの有用なバイオマーカーである[36]。発明者らは、上記のドナーDNAカセットを

10

20

30

40

50

運ぶ AAV ベクターを生成した：合成スプライシングアクセプターシグナル (SAS)、最後のアルブミンエキソン (ex14)、ヒト ARSB (hARSB) のコード配列とそれに続く T2A 配列、ならびに gRNA または対照としてスクランブル配列のいずれかの gRNA 発現カセットを含む (図 2A)。gRNA ドナーベクターまたは scRNA ベクターを、HLP-SpCas9 ベクターと組み合わせて (図 2A)、新生児 MPS VI マウス (p1-2) に全身的に共投与した。血清 ARSB 活性は、正常な同腹仔よりも高いレベルで gRNA 処理 MPS VI マウスで測定され (図 2B)、1 歳まで経時的に安定していた。スクランブル処理または未処理の MPS VI マウスでは、血清 ARSB 活性は検出されなかった。重要なことに、p60 ではスクランブル処理群と gRNA 処理群との間で尿中 GAG に有意な差は観察されなかったが、AAV-HITI 媒介 ARSB 発現は、p90 から p360 まで尿中 GAG を正常化することができた (図 2C)。

10

【0316】

< AAV-HITI の用量反応 >

発明者らは、ムコ多糖症 VI 型 (MPS VI) のアリルスルファターゼ B (ArSB) -/- マウスモデルを、3' アルブミン遺伝子座に ARSB のプロモーターレスコード配列を有するドナー DNA を組み込むことによって治療するために、3つの用量の AAV-HITI を検証した。動物には生後 1~2 日目に 3つの用量の AAV-HITI を投与した：1.2E+14 総ゲノムコピー (GC) / kg (高用量または HD) - 3.9E+13 総 GC / kg (中用量または MD) および 1.2E+13 総 GC / kg (低用量または LD)。血清サンプルに対する発明者らの ARSB 免疫アッセイによる予備的結果は、HD および MD が生後 30 日齢に分泌された活性 ARSB の超生理学的レベルを達成することを示す (図 7)。LD もまた、様々なレベルで活性 ARSB の分泌を誘導した (図 7)。

20

【0317】

[実施例 3]

新生児血友病マウスにおけるマウス 3' Alb (mAlb) 遺伝子座への HITI 媒介 F8 codopV3 組込み。

【0318】

発明者らは、血友病新生児マウスの 3' mAlb 遺伝子座に F8 CodopV3 導入遺伝子をノックインするための in vivo 実験を行った。この目的のために、以下の 3つの異なる AAV8 ベクターを生成した：ハイブリッド肝臓プロモーター (HLP) の発現下で U6-gRNA または U6-scRNA 発現カセットを有する SpCas9 をコードする 2つのベクター；および HITI ドナー F8 CodopV3 コード配列 (CDS) を含む 1つのベクター。具体的には、ドナー DNA カセットには、合成スプライシングアクセプターシグナル (SAS)、最後のアルブミンエキソン (ex14) と、それに続く T2A 配列および F8 CodopV3 のコード配列が含まれる (図 3A)。血友病マウスを 2つの異なる処理群 (gRNA または scRNA) に分け、生後 1 日目 (p1) に側頭静脈を介して 1:1 の比率でベクターの混合物を投与した。3' mAlb 遺伝子座に F8 CDS を組み込むために、gRNA 群には、U6 プロモーターおよび gRNA 配列とともに SpCas9 をコードするベクターと、HITI ドナーを運ぶベクターを注射した。陰性対照として、scRNA 群は、同じ実験スキームに従って処理し、SpCas9 を運ぶベクターには U6-scRNA 発現カセットが含まれていた。ベクター投与の 4 週間後に血漿サンプルを採取した。

30

40

【0319】

F8 活性を機能的発色アッセイを使用してモニターしたところ、F8 活性レベルが非罹患対照と比較して 20% であることが示された (図 3B)。

【0320】

< gRNA 配列 >

50

【表 3】

gRNA A	gRNAの配列	位置	オンタ ゲッ スコア	オフタ ゲッ スコア	標的配列 5'-3'方向の配列
1	5'GTATTTAATAGGCAG CAGTG-3' (配列番号2)	イントロン 1 3 (283位 , 負鎖)	78.3	64.2	5'-CACTGCTGCCTA TTAAATAC-3' [配列番号1] (5'->3', 正鎖)

表 1 : マウスアルブミン遺伝子座のイントロン 1 3 における gRNA 配列

10

【 0 3 2 1 】

【表 4】

プライマー名	プライマー配列	PCR産物の サイズ(bp)
<i>Alb</i> イントロン 13 インデル Fwd	5'-TGGATACATGTTGCAAGGCTG C-3' [配列番号3]	652
<i>Alb</i> イントロン 13 インデル Rev	5'-GGCGTCTTTGCATCTAGTGACA -3' [配列番号4]	
<i>Alb</i> HITI 5' 結合 Fwd	5'-CACGTGGTCAGGTGTAGCTC-3' [配列番号5]	196
<i>Alb</i> HITI 5' 結合Rev	5'-TGGAGAGAAAGGCAAAGTGGA -3' [配列番号6]	
<i>Alb</i> HITI 3' 結合Fwd	5'-CAGCAAGGGGGAGGATTGG-3' [配列番号7]	169
<i>Alb</i> HITI 3' 結合Rev	5'-GAAACATTTTCAGGGCAAGGT-3' [配列番号8]	

20

30

表 2 : 3'mアルブミン遺伝子座に使用したプライマー

【 0 3 2 2 】

ヒトアルブミン (hALB) の 9 番目、11 番目、12 番目、13 番目または 14 番目のイントロンを標的とするオンターゲットおよびオフターゲットスコアが最良に予測された gRNA を設計し、表 3 に報告した。

【 0 3 2 3 】

40

50

【表 5】

gRNA A	gRNAの配列	位置	オンター ゲットスコ ア	オフター ゲットスコ ア	5'-3' 方向の標的配列
1	5'-AATCTCTGGACGGAAGC TCA-3' (配列番号10)	イントロ ン 13 (456 位, 負鎖)	66,4	41,9	5'-TGAGCTTCCGTCAGAG GATT-3' [配列番号9] (5'->3', 正鎖)
2	5'-ACAGTATGGCACAATAG AGC-3' (配列番号12)	イントロ ン 13 (173 位, 負鎖)	53,5	44,4	5'-GCTCTATTGTGCCATA CTGT-3' [配列番号11] (5'->3', 正鎖)
3	5'-ACACTACATAACGTGAT GAG-3'	イントロ ン 12 (927 位, 正鎖)	65,3	85,0	5'-ACACTACATAACGTGA TGAG-3' [配列番号13] (3'->5', 負鎖)
4	5'-AAATAGTTTAGAATAGT GGT-3' (配列番号14)	イントロ ン 14 (123 位, 負鎖)	66,3	57,3	5'-ACCACTATTCTAAACT ATTT-3' [配列番号15] (5'->3', 正鎖)
5	5'-GTGGGCTGTAATCATCG TCT-3' (配列番号16)	イントロ ン 12 (538 位, 正鎖)	58,3	46,9	5'- GTGGGCTGTAATCAT CGTCT -3' (5'->3', 正鎖)
6	5'-TATTGGCAGTCAAGGCC CCG-3' (配列番号17)	イントロ ン 11 (152 位, 正鎖)	N.A.	N.A.	5'- TATTGGCAGTCAAGG CCCCG -3' (5'->3', 正鎖)
7	5'-TCGAATGTATTGTGACA GAG-3' (配列番号18)	イントロ ン 9 (733 位, 正鎖)	71.0	41.1	5'- TCGAATGTATTGTGAC AGAG -3' (5'->3', 正鎖)

10

20

30

表 3 : ヒトアルブミンを標的とする gRNA 位置は各イントロンの最初のヌクレオチドを基準とする。オンターゲットスコアおよびオフターゲットスコアは、Benchling を使用して計算された予測である。N. A. : 利用不可

40

【0324】

gRNA はゲノム DNA のいずれかの鎖上に設計され、5' - 3' の方向で示されている。配列は 5' - 3' の方向で示されている。

【0325】

< 血清アルブミンレベル >

血清アルブミンレベルは、処理マウスおよび対照マウスから p 360 で採取した血液サンプルから、製造者の指示に従って ELISA キット (Abcam, 108791, ケンブリッジ, UK) を用いて測定した (図 4)。血清アルブミンレベルは、処理群とは無関係に同様であることが判明した。これは、発明者らの AA V - H I T I は内因性タンパク

50

質の発現に影響を与えないことを意味する。

【0326】

< アルファフェトプロテインレベル >

アルファフェトプロテイン (AFP) レベルの上昇は、マウスにおける肝細胞癌 (HCC) と関連していることが報告されている (Ferla et al., Molecular Therapy: Methods & Clinical Development 2021)。発明者らは、処理マウスおよび対照マウスの p360 における血清サンプルにおいて、製造者の指示に従ってマウスアルファフェトプロテイン / AFP Quantikine Elisa キット (R&D Systems, ミネアポリス, MN, USA) を使用して AFP レベルを測定した。マウス AFP レベルは、AAV-HITIG RNA 処理マウスでは増加していたが、scRNA および対照では増加していなかった (図5)。

10

【0327】

< オフターゲット解析 >

オンターゲット部位 (OMT) を介する潜在的な染色体異常 (転座事象として) を調査するために、発明者らは、以前に記載された技術である CAST-seq 解析 (Turchiano et al., 2021) を、発明者らの AAV-HITIG RNA の肝臓 DNA サンプルで行った一方、AAV-HITIG scRNA および未処理の肝臓 DNA サンプルを対照として使用した。CAST-seq 解析データは、発明者らの AAV-HITIG RNA サンプルがオンターゲット部位で欠失事象を示すが、OMT は認められなかったことを示す (図6)。

20

【0328】

[実施例 4]

< 3' ヒトアルブミン (ALB) 遺伝子座を標的とする gRNA の選択 >

発明者らは、Benchling および / または CHOPCHOP ソフトウェアを使用して、ALB のイントロン 13 を標的とする 1 つの gRNA および ALB のイントロン 9 および 11 ~ 13 を標的とする 8 つの gRNA を選択した (表4)。in-silico 選択は、i) 予測されるオフターゲットの数が少ないこと、および ii) 所望の遺伝子座を標的とする効率が高いことに基づいていた。CBh プロモーターの下で Cas9-EGFP をコードするプラスミドと、ヒト U6 プロモーターの下で選択された gRNA または scRNA の 1 つを、HEPA 1-6 細胞または HEK293 細胞にトランスフェクションし、それぞれ Alb 遺伝子座または ALB 遺伝子座を標的とした。HEPA 1-6 細胞は、Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, MA, USA) を使用して 1 μg のプラスミド DNA でトランスフェクションした一方、HEK293 細胞はリン酸カルシウムを使用して 1 μg のプラスミド DNA でトランスフェクションした。Cas9-EGFP を発現するソーティングされた細胞から DNA を抽出し、gRNA によって認識されるゲノム領域を PCR 増幅した。PCR 産物を T7 酵素 (Neb, イプスウィッチ, MA, USA) で消化して、Cas9 媒介 INDEL を検出した。同じ PCR 産物を Sanger シークエンシングし、Synthego の ICE ソフトウェアを使用して INDEL の定量を行った。gRNA 0 (Alb イントロン 13) および gRNA 3 および 5 (ALB イントロン 12) は高い Cas9 媒介 INDEL を誘導する一方、より低いレベルが gRNA 2 (ALB イントロン 13) を使用して検出され、gRNA 1 (ALB イントロン 13) および gRNA 4 (ALB イントロン 14) のいずれを使用しても INDEL は検出されなかった (表4 および 図8)。ALB 遺伝子座を標的とする gRNA によって認識される配列の対立遺伝子変異頻度を、選択された gRNA について、集約されたヒトゲノムデータベース (gnomAD) バージョン 3.1.2 を使用して分析した。最も高く検出された対立遺伝子変異頻度は、10³ 対立遺伝子あたり 1 つの SNP (gRNA 3 および 6) であり、重要なことに、ホモ接合性の変異は存在しない。

30

40

【0329】

50

< 3' A1b 遺伝子座および 3' ALB 遺伝子座の組み込み効率 >

発明者らは、3' A1b 遺伝子座に組み込むための gRNA0 の逆位配列または 3' ALB 遺伝子座に組み込むための gRNA3 もしくは 5 の逆位配列に隣接する HITID ナーを生成することによって、3' A1b 遺伝子座および 3' ALB 遺伝子座への HITID 媒介組み込み効率を評価した。ドナーは、合成スプライシングアクセプターシグナル、A1b のエキソン 14 または ALB のエキソン 13 - 14 をコードし、T2A スキッピングペプチドを介して蛍光レポーター DsRed コード配列に連結している。発明者らは、Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific, ウォルサム, MA, USA) を使用して、Cas9 - EGFP および gRNA0 をコードする 1 μg のプラスミド DNA と gRNA0 に隣接するドナー DNA をコードする 1 μg のプラスミド DNA で HEP A 1 - 6 細胞をトランスフェクションした; 同様に、ヒト肝癌細胞株 7 (H U H 7) を、Cas9 - EGFP および gRNA3 をコードする 1 μg のプラスミド + gRNA3 に隣接する HITID ナーをコードする 1 μg のプラスミド、または Cas9 - EGFP および gRNA5 をコードする 1 μg のプラスミド + gRNA5 に隣接する HITID ナーをコードする 1 μg のプラスミドでトランスフェクションした。HITID ナーおよび Cas9 - EGFP をコードするプラスミド DNA および scRNA でトランスフェクションされた細胞を使用して、DsRed 蛍光を正規化し、生産的な HITID ナー組み込みのみを定量化した。蛍光活性化細胞選別解析により、gRNA0 および gRNA3 がそれぞれ 3' A1b 遺伝子座と 3' ALB 遺伝子座で、HITID ナーの生産的な組み込みを誘導することが示された (図 9)。

10

20

【0330】

30

40

50

【表 6】

遺伝子	ID gRNA	gRNA 配列	配列番号	インデル(% ± SEM)	対立遺伝子変異頻度
<i>Alb</i> イントロン 13	gRNA 0	5'-GTATTTAATAGGCAGCAGTGTGG- 3'	54	58.7 ± 6.2	/
<i>ALB</i> イントロン 13	gRNA 1	5'-AATCTCTGGACGGAAGCTCACGG- 3'	92	検出さ れず	実施せず
<i>ALB</i> イントロン 13	gRNA 2	5'-ACAGTATGGCACAATAGAGCAGG- 3'	93	20.7 ± 4.4	実施せず
<i>ALB</i> イントロン 12	gRNA 3	5'-ACACTACATAACGTGATGAGAGG- 3'	94	54.0 ± 5.8	10 ³ -10 ⁵ 対 立遺伝子 あたり 1 つの SNP 5つの SNP の可能性
<i>ALB</i> イントロン 14	gRNA 4	5'-AAATAGTTTAGAATAGTGGTCCG- 3'	95	検出さ れず	実施せず
<i>ALB</i> イントロン 12	gRNA 5	5'-GTGGGCTGTAATCATCGTCTAGG- 3'	96	54.3 ± 3.0	10 ⁴ -10 ⁵ 対 立遺伝子 あたり 1 つの SNP 5つの SNP の可能性
<i>ALB</i> イントロン 11	gRNA 6	5'-TATTGGCAGTCAAGGCCCGAGG- 3'	97	継続中	10 ³ -10 ⁶ 対 立遺伝子 あたり 1 つの SNP 4つの SNP の可能性
<i>ALB</i> イントロン 9	gRNA 7	5'-TCGAATGTATTGTGACAGAGCGG- 3'	98	継続中	10 ⁴ -10 ⁶ 対 立遺伝子 あたり 1 つの SNP 11 の SNP の可能性

表 4 : 3'マウス (A I b) またはヒト (A L B) アルブミン遺伝子座を標的とする g R
N A

表は、全ての g R N A (P A M 配列は下線で示される) および A I b または A L B の標的
イントロン、平均±平均の標準誤差として示される I N D E L の % (n = 3 回の独立した
実験)、および対立遺伝子変異頻度を示す。S E M = 平均の標準誤差

【 0 3 3 1 】

[実施例 5]

3' m A l b 遺伝子座における A A V - H I T I プラットフォームの精度

発明者らの A A V - H I T I 戦略の精度を評価するために、発明者らはいくつかの分子
解析を行った。まず発明者らは、発明者らを選択した g R N A の切断効率 (インデル%)
を調べた。A A V - H I T I g R N A または A A V - H I T I s c R N A 処理 M P S
V I マウスの肝臓から抽出したゲノム DNA で I l l u m i n a - s e q N G S 分析を
行った。発明者らは、A A V - H I T I g R N A 処理マウスでのみ 29% のインデルを
見出した (図 10 A)。さらに、発明者らはまた、c a s 9 誘導二本鎖切断時にオンター

10

20

30

40

50

ゲット部位に組み込まれた AAVベクターゲノムの一部を見出すことができるかどうかを評価した。HITIドナーDNAまたはCas9のいずれかの全AAVベクターゲノムを参照配列として使用して、発明者らはIllumina-seq NGS実験から生成されたリードをアライメントした。発明者らは、与えられたAAVベクターゲノムの異なる部分をカバーするリードをアラインメントすることができ、大部分のリードがITR領域をカバーしていた(図10B)。次に、発明者らは、HITI媒介組込みをITR媒介組込みと比較して評価した。この目的のために、発明者らは、HITIGRNAドナーDNAと同じ構造を有するが、その5'と3'末端で逆位gRNA部位に隣接していないドナーDNA(ITRドナー)を生成した。この構築物を次にAAV8として産生し、*in vivo*で使用した。野生型マウスにp1-2でAAV-Cas9とDs-Redコード配列を含むAAV-ITRドナーの混合物を側頭静脈注射した(以前にHITIドナーDNAについて記載したように)。並行して、第二の群のマウスにAAV-Cas9およびAAV-HITIGRNAドナーの組合せを注射した。両群を処理後1ヶ月で殺し、処理した全ての動物の肝臓からDNAを抽出し、更なる分子解析に使用した。

【0332】

特異的プライマー(表2)を用いて、挿入されたドナーDNAと内因性遺伝子座との間の5'と3'結合部位の両方をPCR増幅した。

【0333】

アガロースゲルに見られるように(図10C)、受け取ったドナー(HITIまたはITRドナー)に従って、予想されるサイズの結合バンド(5'と3')をPCR増幅することができた。興味深いことに、HITI処理マウスでは、AAV-ITRドナーgRNA処理サンプルで観察されたものと同じサイズで、より薄い但上方のバンドも観察された。上方のバンドおよび予想されるサイズのバンドの両方で行ったサンガーシーケンシング分析は、HITIドナーDNA処理動物において、ドナーDNAの組込みがITRを介しても起こっていることを明らかにした。

【0334】

次に、発明者らは、潜在的なgRNAオフターゲット活性を評価した。この目的のために、発明者らはCRISPORを使用して予測された上位10のオフターゲットを選択した(表5)。肝臓ゲノムDNAから得られたPCRバンドでNGS分析を行ったところ、選択されたオフターゲット遺伝子座(gRNAおよびscRNA処理サンプルの両方)のそれぞれについて、オフターゲット編集事象は非常に低いか、または検出不能なであった(図10D)。

【0335】

表5

【表 7】

gRNA 特異性	領域	位置	(5'3') gRNA 配列 + PAM	配列番号	ミスマッチ	オフターゲット CDF 値
オフターゲット	イントロ: Pp1c	chr5: 90622727-90622747:-	GTATTTAATAGGCAGCAGTG TGG	54	-	-
オフターゲット 1	イントロ: Rik	chr5: 151333345-151333367:-	TTACTTAATAAGCAGCAGTG TGG * * *	99	3	0.647
オフターゲット 2	イントロ: Ltr 1	chr12: 69224137-69224159:-	GTTTTAAAAAGCAGAAAGTG GGG * * * * *	100	4	0.646
オフターゲット 3	遺伝子間: Pp1c-Tnks2	chr19: 36774036-36774058:-	TTATCTAATAGACAGCAATG CGG * * * * *	101	4	0.646
オフターゲット 4	イントロ: Zim2	chr7: 6660686-6660708:+	GAATTTGATAGACAGCAGTG GGG * * *	102	3	0.557
オフターゲット 5	イントロ: Slc39a12	chr2: 14426612-14426634:+	GTATTTAGAAAGGCAGCAGTT TGG ** * *	103	3	0.476
オフターゲット 6	イントロ: Gsted	chr3: 132751735-132751757:-	AAATTTGATTTGGCAGCAGTG TGG ** * * *	104	4	0.474
オフターゲット 7	イントロ: Kcne1	chr7: 46060812-46060834:-	GTATTTAAAAAGGCTGAAAGTA AGG * * * * *	105	4	0.464
オフターゲット 8	遺伝子間: Rik/Lhfp13-Lhfp13	chr5: 23268978-23269000:+	ATATTTCAAAGTGGCAGCAGTG AGG * **	106	4	0.446
オフターゲット 9	イントロ: Dpyd	chr3: 119141669-119141691:+	ATATTTAATAGGCAACATTT AGG * * * * *	107	4	0.395
オフターゲット 10	イントロ: Hcn2	chr10: 79561901-79561923:+	GGATTCAGTAGGCAGCAGTTGGG * * * * *	108	4	0.392

10

20

30

40

【 0 3 3 6 】

< 配列 >

< 上記実施例 1 の配列 >

5' - I T R

【 0 3 3 7 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTCTGGGCGAC
CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCA
ACTCCATCACTAGGGGTTTCT [配列番号 110]

【 0 3 3 8 】

50

マウスアルブミンイントロン 1 3 の g R N A 配列

【 0 3 3 9 】

CACTGCTGCCTATTAAATAC [配列番号1]

【 0 3 4 0 】

s c R N A 配列

【 0 3 4 1 】

gactcgcgcgagtcgaggag [配列番号111]

【 0 3 4 2 】

P A M なしのマウスアルブミンイントロン 1 3 の逆位 g R N A 配列

【 0 3 4 3 】

CACTGCTGCCTATTAAATAC [配列番号1]

【 0 3 4 4 】

マウスアルブミンイントロン 1 3 の逆位 g R N A 配列 + P A M 配列 (下線部)

【 0 3 4 5 】

CCACACTGCTGCCTATTAAATAC [配列番号20]

【 0 3 4 6 】

スプライスアクセプター配列

【 0 3 4 7 】

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG [配列番号21]

【 0 3 4 8 】

エキソン 1 4 マウスアルブミン

【 0 3 4 9 】

GGTCCAAACCTTGTCAGTAGATGCAAAGACGCCTTAGCC [配列番号22]

【 0 3 5 0 】

T h o s e a a s i g n a ウイルス 2 A (T 2 A) スキッピングペプチド

【 0 3 5 1 】

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
TGGACCT [配列番号23]

【 0 3 5 2 】

D i s c o s o m a R e d (D s R e d) コード配列

【 0 3 5 3 】

ATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGA
GGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCT
ACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTC
GCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCA
CCCCGCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGG
AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCC
CTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAACTTCCCCTC
CGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCC
TGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAG
GGCGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGT
GAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACG
AGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTC
CAGTAG [配列番号24]

【 0 3 5 4 】

ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (W P R E)

【 0 3 5 5 】

aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgfttgctccttttacgct
atgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcctt

10

20

30

40

50

gtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagtgtggtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtg
 cactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggac
 ttfcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacagg
 ggctcggctgttggggcactgacaattccgtggtgttgcggggaaatcatcgtcctttccttggctgct
 cgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagc
 ggaccttccctcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcg [配列番号25]

【0356】

ウシ成長ホルモンポリA (BGH pA)

【0357】

GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCT 10
 TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
 TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA [配列番号26]

【0358】

ヒトU6プロモーター

【0359】

tttcccatgattccttcatatttgcataatacagatacaaggctgttagagagataattggaattaatttgac
 tgtaaacacaaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgacgt
 tttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatcttgcatttcttggcttt
 atatatcttgtggaaaggacg [配列番号27] 20

【0360】

キメラRNA足場

【0361】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
 AAGTGGCACCGAGTCGGTGC [配列番号28]

【0362】

3' - ITR

【0363】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT 30
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号29]

【0364】

構築物 p1492 __pTIGEM__malb3' HITIドナー (SAS__albe x 1
 4__T2A__dsRED__bGHPA) + U6gRNA malb3'

【0365】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
 CCATCACTAGGGGTTCTGCTAGTGCTAGCGGCGCGCCTCTAGCCCACTGCTGCC
 TATTAATAACGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCC
 ACAGGGTCCAAACCTTGTCACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCCGGAAGCGGAGAGG 40
 GCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTATGGAT
 AGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTC
 CGTGAACGGCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGG
 GCACCCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTTCGCCTGG
 GACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGC
 CGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCG
 TGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAG
 GACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGG
 CCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACC
 CCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGC 50

GGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCT
 GCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACT
 ACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAG
 GATCCaatcaacctctggattacaaaatftgtgaaagattgactggattcttaactatgfttgccttt
 tacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctc
 ctcttgtataaatcctggttgccttctctttatgaggagtgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtg
 gtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttcc
 gggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttggccgctgctgg
 acaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtgggtgttgcggggaaatcatcgtcctttccttgg
 ctgctcgcctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatc
 cagcggaccttccctcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgAGATCTGCC
 TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCC
 TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGC
 ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA
 GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACCACACTGCTGCC
 TATTAATAACGAGCTCTTGTCGAGGTCGACATTTAAATGAAGGGCGAATTCAATTT
 GAGGGCCTAtttcccatgattccttcatatftgcatatacgatacaaggctgtagagagataattgg
 aattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgg
 gtagtttgcagttttaaattatgtttttaaattggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttgc
 atttcttggctttatatacttftgtggaaggacgAAACACCGTATTTAATAGGCAGCAGTGGT
 TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAA
 GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
 GGCTAGTCCGTTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTA
 CCAATTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC
 GCTCACTGAGGCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG
 CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号30]

【0366】

構築物 p 1 4 9 6 __ p T I G E M __ m A l b 3 ' H I T I ドナー (S A S __ a l b e x 1
 4 __ T 2 A __ d s R E D __ b G H p A) + U 6 スクランブル RNA m A l b 3 '

【0367】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGCGAC
 CTTTGGTCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
 CCATCACTAGGGGTTCTGCTAGTGCTAGCGGCGCGCCTCTAGCCACACTGCTGCC
 TATTAATAACGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCC
 ACAGGGTCCAAACCTTGTCACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCCGGAAGCGGAGAGG
 GCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTATGGAT
 AGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTC
 CGTGAACGGCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAAGCCCTACGAGG
 GCACCCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTTCGCTGG
 GACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGC
 CGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCG
 TGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAG
 GACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAAGTTCCCTCCGACGG
 CCCCCTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACC
 CCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGC
 GGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCT
 GCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACT
 ACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAG
 GATCCaatcaacctctggattacaaaatftgtgaaagattgactggattcttaactatgfttgccttt
 tacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctc

10

20

30

40

50

ctccttgataaaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtg
 gtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggftggggcattgccaccacctgtcagctcctttcc
 gggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgctgg
 acaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtgggtgttgcggggaaatcatcgctcctttccttg
 ctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatc
 cagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgAGATCTGCC
 TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTGCCTTCC
 TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGC
 ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA
 GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACCACACTGCTGCC
 TATTAATAACGAGCTCTTGTCGAGGTCGACCTGACCTCGAGtttcccatgattccttcata
 tttgcatatacगतacaaggctgttagagagataattggaattaatttgactgtaaacacaaagatatt
 agtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaa
 atggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgtggaaagg
 acgAAACACCCGgactcgcgcgagtcgaggagGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
 ATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGTCTTTTTTGT
 TTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTCTAGAGGTACCAATTGAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

10

[配列番号31]

20

【0368】

< 上記実施例 2 の配列 >

5' - I T R

【0369】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGAC
 CTTTGGTGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
 CCATCACTAGGGGTTCCCT [配列番号110]

【0370】

マウスアルブミンイントロン 1 3 の g R N A 配列 (正鎖 5' - 3' 方向)

【0371】

CACTGCTGCCTATTAATAAC [配列番号1]

【0372】

s c R N A 配列

【0373】

gactcgcgcgagtcgaggag [配列番号111]

【0374】

P A M なしのマウスアルブミンイントロン 1 3 の逆位 g R N A 配列

【0375】

CACTGCTGCCTATTAATAAC [配列番号1]

【0376】

マウスアルブミンイントロン 1 3 の逆位 g R N A 配列 + P A M 配列

【0377】

CCCACTGCTGCCTATTAATAAC [配列番号20]

【0378】

スプライシングアクセプター配列

【0379】

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG [配列番
 号21]

【0380】

エキソン 1 4 マウスアルブミン

30

40

50

【 0 3 8 1 】

GGTCCAAACCTTGTCACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCC [配列番号22]

【 0 3 8 2 】

Those assigna ウイルス 2 A (T 2 A) スキッピングペプチド

【 0 3 8 3 】

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCC
TGGACCT [配列番号23]

【 0 3 8 4 】

A R S B コード配列

【 0 3 8 5 】

atgggtccgcgcgggcgggcgagcctgccccgaggccccggacctcggcgggctgctcctccccgtcg
tcctcccgtgctgctgctgctgttgttggcgccgcccgggctcgggcgccggggccagccggccgccc
ccacctggtcttcttctgctggcagacgacctaggctggaacgacgctcggcttccacggctcccgcaccc
gcacgcccgcacctggacgctggtggcgccggcggggtgctcctggacaactactacacgcagccgct
gtgcacgcccgtcgcggagccagctgctcactggccgctaccagatccgtacaggtttacagcaccaa
ataatctggccctgtcagcccagctgtgttctctggatgaaaaactcctgccccagctcctaaaagaa
gcaggttatactaccatattggtcggaaaatggcacctgggaatgtaccggaagaatgccttccaac
ccgcccaggatttgatacctactttggatactcctgggtagtgaagattatttcccatgaacgctgt
acattaattgacgctctgaatgtcacacgatgtgctcttgattttcgagatggcgaagaagtgtcaaca
ggatataaaaatatgtattcaaaaacatattcaccaaaagggtatagccctcataactaacatcca
ccagagaagcctctgtttctctaccttgcctccagctgtgcatgagccccttcaggtccctgaggaa
acttgaagccatattgactttatccaagacaagaacaggcatcactatgcaggaatgggtgtcccttatgg
atgaagcagtaggaaatgtcactgcagctttaaagcagtgggctctggaacaacacgggtgttcac
ttttctacagataacggaggggcagactttggcagggggtaataactggcccccttcgaggaagaaaatg
gagcctgtgggaaggaggcgtccgaggggtgggctttgtggcaagccccttgcctgaagcagaagg
cgtgaagaaccgggagctcatccacatctctgactggctgccaacactcgtgaagctggccagggga
cacaccaatggcacaagcctctggatggcttcgacgtgtggaaaaccatcagtgaaaggaagcccat
ccccagaattgagctgctgcataatattgaccggaacttcgtggactcttcaccgtgtcccaggaaca
gcatggctccagcaaaggatgactcttctctccagaatattcagcctttaacacatctgtccatgctgc
aattagacatggaaattggaaactcctcacgggctaccagggctgtggttactggttccctccaccgct
tcaatacaatgtttctgagataccctcatcagaccaccaaccaagaccctctggctctttgatattgat
cgggaccctgaagaaagacatgacctgtccagagaatatcctcacatcgtcacaagctcctgtcccg
cctacagttctaccataaacactcagctcccgtgtacttccctgcacaggacccccgctgtgatcccaa
ggccactgggggtgtggggcccttggatgtag [配列番号33]

10

20

30

【 0 3 8 6 】

ウシ成長ホルモンポリ A (B G H p A)

【 0 3 8 7 】

GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCT
TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAAT
TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA [配列番号26]

40

【 0 3 8 8 】

ヒトU6プロモーター

【 0 3 8 9 】

tttcccatgattccttcatatttgcataatacgaatacaaggctgttagagagataattggaattaatttgac
tgtaaacacaaaagatattagtaaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgagct
tttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggcttt
atatactttgtggaaaggacg [配列番号27]

【 0 3 9 0 】

キメラRNA足場

50

【 0 3 9 1 】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCGAGTCGGTGC [配列番号28]

【 0 3 9 2 】

3' - I T R

【 0 3 9 3 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号29]

【 0 3 9 4 】

構築物 p 1 4 7 9 __ p T I G E M __ m A l b 3 ' H I T I ドナー (S A S __ a l b e x 1
4 __ T 2 A __ A R S B __ b G H p A) + U 6 g R N A m A l b 3 '

【 0 3 9 5 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTGCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCCCTtgtagttaatgattaaccgcatgctacttatctacgtagccatgct
ctaggaagatcgggaattcgcccttaactagtaacggccgccagtgctgctggaattcaggctgacctc
gagtttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgttagagagataattggaattaatt
tgactgtaaacacaaagatattagtaaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttg
cagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttg
gctttatatatcttgtggaaaggacgAAACACCGTATTTAATAGGCAGCAGTGGTTTTAGA
GCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCA
CCGAGTCGGTGCTTTTTTgttttagagctagaaatagcaagctcgagcagctcctgaattctgca
gatatccatcacactggcggcttaagctagcactagtaacggccgccagtgctgctggaattcgccctt
CCACACTGCTGCCTATTAATACTccccagcatgcttgcctattgtcttcccaatcctcccccttg
ctgtcctgccccacccccacccccagaatagaatgacacactactcagacaatgcatgcaatttctc
ttttattaggaaaggacagtgaggagtgccaccttccagggtcaaggaaggcacgggggaggggcaa
acaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgagggcagatctactagaatcgataagcttgattc
gagctacatccaaggggccccacccccagtgcccttgggatcacagcgggggtcctgtgaggggag
tacacgggggactgagtgttatggtagaactgtaggcgggacagggagctttgtgacgatgtgaggata
ttctctggacaggtcatgtctttcttcagggtcccgatcaatatcaaagagccagaggggtcttgggtg
tgggtctgatgagggtatctcagaaacattgtattgagacgggtggaggggaaccagtaaccacagcctg
ggtagcccgtgaggagtttccaatttccatgtctaattgcagcatggacagatgtgttaaaggctgaat
attctggaagagaagagtcacctttgctggagccatgctgttccctgggacacgggtgaagagtccacg
aagttcgggtcaatattatgcagcagctcaattctgggggatgggcttccctcactgatggttttccac
acgtcgaagccatccagaggctttgtgccattgggtgtgtcccctggccagcttcacgagtggtggcag
ccagtcagagatgtggatgagctccgggttcttcacgcccttctgcttcagcaaggggcttgcacaa
agccccacctcggacgcctccttcccacagggctccattttcttccctcgaaggggcccagttattaccc
ctgccaaagtctgccctccggttatctgtagaaaagatgaacaccgtgttggttccagagcccactgcttt
ttaaagctgcagtgacatttctactgcttcatccataagggacaccattcctgcatagtgatgcctgtt
cttgtcttggataaagtcatatggcttcaagtattcctcagggacctgaaggggctcatgcacagactg
gagagcaaggtagagaaaacagaggcttctctgggtggatggttagttaggggctatagcccttttgg
tgaatatgtttgttgaatacatatTTTTATAATCCTgttgcaacttcttcgccatctcgaaaaatcaagagca
catcgtgtgacattcagagcgtcaattaatgtacagcgttcatgggaataataatcttccactaccag
agatatccaaagtaggtatcaaatcctcggcgggttggaaaggcattcttccgggtacattcccagggtgc
cattttccgaccatatgggtagtataacctgcttcttttaggagctggggcaggagttttcatccagag
gaacacagctgggctgacagggccagattatttgggtgctgtaaacctgtacggatctggtagcggcca
gtgagcagctggctccgcgacggcgtgcacagcggctgctgtagtagttgtccaggagcaccgccg
cggccgcccagcgcgtccaggtgcggcgtgcggatgcgggagccgtggaagccgacgtcgttccagc
ctaggtcgtctgccagcaagaagaccaggtggggcgccgctggccccggcgcccagagcccggcg

10

20

30

40

50

gcgccaacaacagcagcagcagcagcagcgggaggacgacggggaggagcagccgccgaggtccggg
gcctcggggcaagctcgcgcgcgcgcggacccataggtccaggattctcctcgacgtcaccgcat
gtagcagacttcctctgccctctccgcttccGGCTAAGGCGTCTTTGCATCTAGTGACAAGG
TTTGGACCctgtggagagaaaggcaaagtggatgtcagtaagaccaataggtgcctatcCCACAC
TGCTGCCTATTAATAACAAGGGCgaattctgcagatatccatcacactggcggccTCGAGtta
agggcgaattcccgataaggatcttcctagagcatggctacgtagataagtagcatggcgggttaatc
attaactacaAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号34]

【0396】

10

構築物 p 1 4 8 0 __ p T I G E M __ m A l b 3 ' H I T I ドナー (S A S __ a l b e x 1
4 __ T 2 A __ A R S B __ b G H p A) + U 6 s c r R N A m A l b 3 '

【0397】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGAC
CTTTGGTCCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCCCTtgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgct
ctaggaagatcgggaattcgcccttaactagtaacggccgccagtgctgctggaattcaggctgacctc
gagtttcccatgattccttcatatttgcataatacagatacaaggctgttagagagataattggaattaatt
tgactgtaaacacaaagatattagtaaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttg
cagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttg
gctttatatatcttgtggaaaggacgAAACACCgGACTCGCGCGAGTCGAGGAGGTTTTAG
AGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCGGTGCTTTTTTgttttagagctagaaatagcaagctcgagcacctgaattctgcag
atatccatcacactggcggccttaagctagcactagtaacggccgccagtgctgctggaattcgcccttC
CACACTGCTGCCTATTAATAACTccccagcatgcctgctattgtcttcccaatcctcccccttgc
tgtcctgccccacccccacccccagaatagaatgacacctactcagacaatgcgatgcaatttcctcat
tttattaggaaaggacagtgaggagtggcaccttccagggtaaggaaggcacgggggaggggcaaa
caacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggcagatctactagaatcgataagcttgattcg
agctacatccaagggccccacacccccagtggccttgggatcacagcgggggtcctgtgcagggaggt
acacggggactgagtgtttatggtagaactgtaggcgggacaggagcttgtgacgatgtgaggat
tctctggacaggtcatgtcttcttcaggggtcccgatcaatatcaaagagccagagggcttgggtggt
gggtctgatgagggtatctcagaaacattgtattgagacgggtggagggaaccagtaaccacagcctg
ggtagcccgtgaggagtttccaatttccatgtctaatgacagatggacagatgtgttaaaggctgaat
attctggaagagaagagtcattcttctgagccatgctgttccctgggacacgggtgaagaggtccacg
aagttcgggtcaatattatgcagcagctcaattctgggggatgggcttccctcactgatggttttccac
acgtcgaagccatccagaggcttctgtccattgggtgtgtcccctggccagcttccagaggttggcag
ccagtcagagatgtggatgagctcccgggttcttccagcccttctgcttcagcaaggggcttggcaca
agccccacccctcggacgcctccttcccacagggctccatttcttccctcgaaggggcccagttattaccc
ctgccaagctcgcctccttctgtgagaaaagatgaacaccgtgttggttccagagcccactgcttt
ftaaagctgcagtgacatttccactgcttcatccataagggacaccattcctgcatagtgatgcctgtt
cttgtcttggataaagtcatatggcttcaagtattcctcagggacctgaaggggctcatgcacagactg
gagagcaaggtagagaaacagaggcttctctgggtggatggttagttatgagggctatagcccttttg
tgaatatgtttgttgaatacatatcttctggtgcaacttcttcgccatctcgaataatcaagagca
catcgtgtgacattcagagcgtcaattaatgtacagcgttcatgggaataataatcttccactaccag
agatatccaaagtaggtatcaaatcctcggcgggttggaaaggcattcttccgggtacattcccagggtg
catttccgaccatatgggtagtataacctgcttcttttaggagctggggcaggagttttcatccagag
gaacacagctgggctgacagggccagattatttgggtgctgtaaacctgtacggatctggtagcggcca
gtgagcagctggctccgcgacggcgtgcacagcggctgcgtgtagtagttgtccaggagcaccgccg
cggccgcccagcgcgtccaggtgcggcgtgcggatgcgggagccgtggaagccgacgtcgttccagc
ctaggtcgtctgccagcaagaagaccaggtggggcggccggctggccccggcgcccagcccggcg

20

30

40

50

gcgccaacaacagcagcagcagcagcagcgggaggacgacggggaggagcagccgcccagggtccggg
gcctcggggcaagctcgcgcgcccgcgaggaccataggtccaggattctcctcgacgtcaccgcat
gtagcagacttcctctgccctctccgcttccGGCTAAGGCGTCTTTGCATCTAGTGACAAGG
TTTGGACCctgtggagagaaaggcaaagtggatgtcagtaagaccaataggtgcctatcCCACAC
TGCTGCCTATTAATAACAAGGGCgaattctgcagatatccatcacactggcggccTCGAGtta
agggcgaattcccgataaggatcttcctagagcatggctacgtagataagtagcatggcggggttaatc
attaactacaAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT
CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号35]

【0398】

10

< 上記実施例3の配列 >

5' - I T R

【0399】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCCCT [配列番号110]

【0400】

PAMなしのマウスアルブミンイントロン13の逆位gRNA配列

【0401】

CACTGCTGCCTATTAATAAC [配列番号1]

20

【0402】

マウスアルブミンイントロン13の逆位gRNA配列 + PAM配列 (下線部)

【0403】

CCACACTGCTGCCTATTAATAAC [配列番号20]

【0404】

スプライシングアクセプター配列

【0405】

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG [配列番
号21]

【0406】

30

エキソン14マウスアルブミン

【0407】

GGTCCAAACCTTGTCACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCC [配列番号22]

【0408】

Those a a s i g n a ウイルス2A (T2A)スキッピングペプチド

【0409】

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
TGGACCT [配列番号23]

【0410】

F8__CodopV3コード配列

40

【0411】

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCT
GCCACCAGGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTC
TGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCT
TCCCCTTCAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGAC
CACCTGTTCAACATTGCCAAGCCAGGCCCCCTGGATGGGCCTGCTGGGCCCCAC
CATCCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCC
ACCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCT
GAGTATGATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGG
GGGCAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTG

50

ACCCCCTGTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTG
 AACTCTGGCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGA
 GAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGTGTGTTTGATGAGGGCA
 AGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCT
 GCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCC
 TGGCCTGATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTA CTGGCATGTGATTGGCATGGGCA
 CCACCCCTGAGGTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAAC
 CACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCT
 GCTGATGGACCTGGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATG
 ATGGCATGGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGG 10
 ATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGAT
 GGATGTGGTGAAGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTG
 TGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGAC
 TGGGACTATGCCCCCTGGTGTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTA
 CCTGAACAATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGG
 CCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATC
 CTGGGCCCCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAA
 CCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCC
 TGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTG
 CCTGGGGAGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAA 20
 GTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGG
 ACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGAC
 CAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTT
 TGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCCTGCCCAACC
 CTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACAGC
 ATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGC
 CTA CTGGTACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTC
 TGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCT
 TCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGC
 TGCCACAACCTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAG 30
 CTGTGACAAGAACA CTGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCT
 ACCTGCTGAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATGCCACT
 AATGTGTCTAACAACAGCAACACCAGCAATGACAGCAATGTGTCTCCCCCAGTGCT
 GAAGAGGCACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGA
 TTGACTATGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTAC
 GACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTT
 CATTGCTGCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCCATGTGC
 TGAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCAG
 GAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCA
 CCTGGGCCCTGCTGGGCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGA 40
 CCTTCAGGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTAT
 GAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGA
 AACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCCACATGGCCCCCACC AAGGATGAGT
 TTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCAC
 TCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCA
 TGGCAGGCAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCTGTTCTTACCATCTTTGATGAAA
 CCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAAC
 ATCCAGATGGAGGACCCACCTTCAAGGAGA ACTACAGGTTCCATGCCATCAATGG
 CTACATCATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGT
 GGTACCTGCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGC 50

CATGTGTTCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTA
 CCCTGGGGTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGG
 TGGAGTGCCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTGTTG
 TACAGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTT
 CCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGC
 ACTACTCTGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAG
 GTGGACCTGCTGGCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCA
 GAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCA
 AGAAGTGGCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGC
 AATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCAG
 ATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTGAGGATGGAGC
 TGATGGGCTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCC
 ATCTCTGATGCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGGCCACCTG
 GAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCC
 AGGTCAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTG
 ACTGGGGTGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGA
 GTTCTGATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACATGCAGATTGAGCTGAG
 CACCTGCTTCTTCTGTGCCTGCTGACCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGT
 GTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCC
 TGCTGACCAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTG
 AGGATGGAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGA [配列番号36]

10

20

【0412】

合成ポリアデニル化シグナル

【0413】

tcgcgaataaaaagatctttatctttcattagatctgtgtgttgggtttttgtgtgatgcagc [配列番号37]

【0414】

3' ITR

【0415】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGGCGACCAAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号29]

30

【0416】

構築物 p1493__pTIGEM__mA1b3' HITIドナー (SAS__a1bex1
 4__T2A__CodopV3__pA)

【0417】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAAGCCCGGGCGTCCGGCGAC
 CTTTGGTCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
 CCATCACTAGGGGTTCTGCTAGGCTAGCGGCGCGCCTCTAGCCACACTGCTGCCT
 ATTAATACGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCA
 CAGGGTCCAAACCTTGTCACTAGATGCAAAGACGCCTTAGCCGGAAGCGGAGAGGG
 CAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTATGCAGA
 TTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCA
 GGAGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTG
 GGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTT
 CAACACCTCTGTGGTGTACAAGAAGACCCTGTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTGT
 TCAACATTGCCAAGCCCAGGCCCCCTGGATGGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAG
 GCTGAGGTGTATGACACTGTGGTGTACCCCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCTGT
 GAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAGTATG
 ATGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGCGAGC
 CACACCTATGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCCT

40

50

GTGCCTGACCTACAGCTACCTGAGCCATGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTG
 GCCTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACC
 CAGACCCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTGCTGTGTTTGATGAGGGCAAGAGCTG
 GCACTCTGAAACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCCTCTGCCAGGG
 CCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGCCTG
 ATTGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTIONGGCATGTGATTGGCATGGGCACCACCCC
 TGAGGTGCACAGCATCTTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGGC
 AGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTCCTGACTGCCCAGACCCTGCTGATG
 GACCTGGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGCCACCAGCATGATGGCAT
 GGAGGCCTATGTGAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGA 10
 ACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTG
 GTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAA
 GAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACT
 ATGCCCCCTGGTGCTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAAC
 AATGGCCCCCAGAGGATTGGCAGGAAGTACAAGAAGGTCAGGTTCATGGCCTACAC
 TGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCC
 CCCTGCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCTGCTGATCATCTTCAAGAACCAGGCC
 AGCAGGCCCTACAACATCTACCCCATGGCATCACTGATGTGAGGCCCTGTACAG
 CAGGAGGCTGCCCAAGGGGGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCTGGGG
 AGATCTTCAAGTACAAGTGGACTGTGACTGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGAC 20
 CCCAGGTGCCTGACCAGATACTACAGCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGC
 CTCTGGCCTGATTGGCCCCCTGCTGATCTGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGG
 GCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATCCTGTTCTCTGTGTTTGATGAG
 AACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATCCAGAGGTTCCCTGCCCAACCCTGCTGG
 GGTGCAGCTGGAGGACCCTGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAATG
 GCTATGTGTTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGG
 TACATCCTGAGCATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTGTCTGTGTTCTTCTCTGGCTAC
 ACCTTCAAGCACAAAGATGGTGTATGAGGACACCCTGACCCTGTTCCCTTCTCTGG
 GGAGACTGTGTTTATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGCTGCCACA
 ACTCTGACTTCAGGAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTGAAAGTCTCCAGCTGTGAC 30
 AAGAACACTIONGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGACATCTCTGCCTACCTGCT
 GAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAGGAGCTTCAGCCAGAATGCCACTAATGTGT
 CTAACAACAGCAACACCAGCAATGACAGCAATGTGTCTCCCCCAGTGCTGAAGAGG
 CACCAGAGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTA
 TGATGACACCATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTACGACGAGG
 ACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCT
 GCTGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCCATGTGCTGAGGAA
 CAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTCAGGAGTTCA
 CTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGC
 CTGCTGGGGCCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAG 40
 GAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTATGAGGAGG
 ACCAGAGGCAGGGGGCTGAGCCCAGGAAGAACTTTGTGAAGCCCAATGAAACCAAG
 ACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACACATGGCCCCCACCAGGATGAGTTTACTG
 CAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCTGGCC
 TGATTGGCCCCCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCTGCCCATGGCAGG
 CAGGTGACTGTGCAGGAGTTTGCCTGTTCTTACCATCTTTGATGAAACCAAGAG
 CTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGGAACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGA
 TGGAGGACCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATC
 ATGGACACCCTGCCTGGCCTGGTGTGATGGCCCAGGACCAGGATCAGGTGGTACCT
 GCTGAGCATGGGCAGCAATGAGAACATCCACAGCATCCACTTCTCTGGCCATGTGT 50

10

20

30

40

50

TCACTGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCTGGG
 GTGTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCTGGCATCTGGAGGGTGGAGTG
 CCTGATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTGTTGTACAGCA
 ACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATC
 ACTGCCTCTGGCCAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACTC
 TGGCAGCATCAATGCCTGGAGCACCAAGGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACC
 TGCTGGCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAGGGGGCCAGGCAGAAGTTC
 AGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAGTG
 GCAGACCTACAGGGGCAACAGCACTGGCACCCCTGATGGTGTCTTTGGCAATGTGG
 ACAGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCATCATTGCCAGATACATC
 AGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACCCCTGAGGATGGAGCTGATGGG
 CTGTGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTG
 ATGCCCAGATCACTGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTGCCACCTGGAGCCCC
 AGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAA
 CAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACTGGGG
 TGACCACCCAGGGGGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCCTG
 ATCAGCAGCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGC
 TTCTTCCTGTGCCTGCTGACCTGTTCTTCCAGAATGGCAAGGTGAAGGTGTTCCAG
 GGCAACCAGGACAGCTTCAACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCCTGCTGAC
 CAGATACCTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGG
 AAGGTGCTGGGCTGTGAGGCCCAGGACCTGTACTGAtcgcgaataaaagatctttattttcat
 tagatctgtgtgttgggtttttgtgtgatgcagcCCACACTGCTGCCTATTAATACCCCAAT
 TGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA
 CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCA
 GTGAGCGAGCGAGCGCGCAG [配列番号38]

10

20

【0418】

構築物__p1139__pAAV2.1.__HLP__SpCas9(HA)__spA

下線はプロモーター配列

Cas9/Cas9-2a-GFP

【0419】

ataacaattcacacaggaaacagctatgacatgattacgccagatttaattaaggctgcgcgctcgc
 tcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctcgggacaccttggtcgcccggcctcagtga
 gcgagcgagcgcgagagaggagtgccaactccatcactaggggttccttgtagttaatgattaac
 ccgccaatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaattcgcccGGAATTCGCCCTT
 AAgcggccgcaagcCTTAAGTGTGTTTGGCTGCTTGCAATGTTTGGCCATTTTAGGGTGGAA
 CACAGGACGCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCAGCCAGTGGACT
 TAGCCCCTGTTTGGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTACCAGCA
 GCCTCCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCC
 TGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCACCGGTacCTG
 CTTTTGCTCGCTTGGATCCCCGGTGCCACCATGTccggtgccaccatgtaccatacgatg
 ttccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcaaggtcgaagcgtccgacaagaagtacagcatcgg
 cctggacatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgagtaaacggtgccagcaag
 aattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgt
 tcgacagcgggcgaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagac
 ggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagctt
 ctccacagactggaagagtcttccctgggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatctc
 ggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtacccaccatctaccacctgagaagaagaa
 tgggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggcccacatgatcaagttc
 cggggccacttctgatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatcc
 agctgggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgcca

30

40

50

ggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgccggc
gagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgccctgagcctggcctgaccccaacttcaaga
gcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga
caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacg
ccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctatg
atcaagagatacgcgagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgc
ctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcgg
agccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccacctggaaaagatggacggcaccgaggaa
ctgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcc
cccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcgggcggcaggaagatttttaccattcctg
aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtgggcccctctgg
ccaggggaaacagcagattcgctggatgaccagaaagagcggaggaaacctcacccccctggaactt
cgaggaagtgggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataag
aacctgcccacgagaagggtgctgcccacgacagcctgctgtacgagcttccacctgtataacga
gctgaccaaaagtgaatacgtgaccgaggggaatgagaaagcccgcttctctgagcggcgagcagaa
aaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgacctgaaagcagctgaaagaggac
tacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctc
cctggggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaaaac
gaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaaac
ggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacac
cggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggcaagacaat
cctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcc
tgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccaggggcgatagcctgacgagcaca
tgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcacctgcagacagtgaaaggtgggtggcag
ctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaaccag
accaccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggcacaaaga
gctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgta
cctgtactacctgcagaatgggcccgggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtcc
gactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaagggtgt
gaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgcccctccgaagagggtcgtgagaagat
gaagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccagagaaagttcgacaatctgacc
aaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctgggtgaa
accggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgaga
atgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctgggtgtccgatttccggaag
gatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccagcccacgacgcctacctgaacgc
cgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcaggttcgtgtacggcgactac
aagggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcagcaggaatcggcaaggctaccgccaag
tacttcttacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccgg
aagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccgggggagatcgtgtgggataaggggccgggattttg
ccacctgcggaagtgctgagcatgcccgaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacagg
cggcttcagcaaagagtctatcctgcccgaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggac
tgggacctaaagaagtacggcggcttcgacagccccacctgtggcctattctgtgctgggtgggcaa
agtggaaaagggaagctccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcacatcatgga
aagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggtacaaagaagtgaaaaag
gacctgatcatcaagctgcctaagctactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggc
ctctgccggcgaactgcagaagggaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttctgtacc
tggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtgga
acagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcagatttccaagagagtgatcctg
gccgacgctaacttggaacaaagtgtgttccgctacaacaagcaccgggataagcccacagagagc
aggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagccccctgccgcttcaagtactttg

10

20

30

40

50

acaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccacca
 gagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggagggcgacagccccaagaag
 aagagaaaggtggaggccagctaagaattcaataaaagatctttatcttcattagatctgtgtgttgg
 ttttgtgtgcgccgcaggaacccttagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgtcgtcgt
 cactgaggccgggacccaaaggtgccccgacgcccgggctttgccccgggcccctcagtgagcga
 gcgagcgcgagctgctgcagggcgccctgatgcggtatcttctccttacgcatctgtgcggtatctc
 acaccgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgccctgtagcggcgcatagcgcggcgggtgtgg
 tggttacgcgagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcggccgctcctttcgtttcttcccttc
 ctttctgcccacgttcgcccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagggttccgatt
 agtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtgggccatcgccc
 tgatagacggtttttcgcccctttgacgttggagtcacgcttcttaaatagtggaactcttgttccaaactg
 gaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgattataagggtatcttgcgatttcggcctattg
 gttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatftaacgcgaatfttaacaaaatattaacgtttacaattfta
 tgggtgcactctcagtaaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgacaccgccaacacc
 cgctgacgcgccctgacgggcttctgctcctccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccg
 ggagctgcatgtgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgagacgaaagggcctcgtgat
 acgcctatctttataggtaaatgtcatgataataatggtttcttagacgctcaggtggcacttttcgggga
 aatgtgcgcggaaccctatctgtttatcttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaata
 accctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcctt
 attccctttttgcgccattttgcttctctgtttttgctcaccagaaacgctgggtgaaagttaaagatg
 ctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgag
 agttttcggcccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattat
 ccggtattgacgcccgggcaagagcaactcggctcggcgatacactattctcagaatgacttgggtgag
 tactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccat
 aacctgagtgataacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacc
 gctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagcc
 ataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacctattaa
 ctggcgaactacttactctagcttccccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgca
 ggaccacttctgcgctcggccccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgt
 ggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgatcgtagttatctacac
 gacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgcctgagataggtgcctcactgatt
 aagcattggtaacgtgcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatt
 aaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacccaaaatccctaacgtgagtttctgtcc
 actgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatct
 gctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccggatcaagagctaccaact
 cttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtag
 ttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgcctctgctaactctgttaccagtg
 gctgctgccagtgccgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggc
 gcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccga
 actgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagccttcccgaagggagaaaggcggacag
 gtatccggtaagcggcagggctcggaaacaggagagcgcacgagggagccttccagggggaaacgcctg
 gtatctttatagtcctgtcgggtttcggccacctctgacttgagcgtcgatcttctgtgatgctcgtcagg
 gggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttccctggccttttctggcctttt
 gctcacatgttcttctcgtgttatccccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctg
 ataccgctcggcgacgggaacgaccgagcgcagcagctcagtgagcggaggaagcgggaagagcgc
 ccaatacgcacaaccgctctccccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcc
 cgactggaaagcgggagctgagcgcacgcaatataatgtgagttagctcactcattaggccaccag
 gctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcgg [配列番号 43]

【 0 4 2 0 】

H I T I 3 ' m A L b f 8 (血友病 A)

10

20

30

40

50

p 1 4 9 8 __ p A A V __ H L P __ S p C a s 9 + U 6 3 ' m a l b __ g R N A (5 , 1 k b)

5 ' I T R

【 0 4 2 1 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTGGGCGAC
CTTTGGTGCCTCGCCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCT (配列番号110)

【 0 4 2 2 】

追加の A A V 配列

【 0 4 2 3 】

Tgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagagctcttgtcgaggctcgacatttaaagta
agggcgaattcaattt (配列番号44)

【 0 4 2 4 】

U 6 発現カセット g R N A

【 0 4 2 5 】

Gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattgga
attaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttggg
tagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcataatgcttaccgtaacttgaaagtatttca
tttcttggctttatataatcttgtggaaaggacgaaacaccgtatttaataggcagcagtggttttagagc
tagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttt
ttgttttagagcta (配列番号45)

【 0 4 2 6 】

H L P プロモーター

【 0 4 2 7 】

TGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTT
CTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCT
CCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCT
CTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG
CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT (配列番号46)

【 0 4 2 8 】

s p C a s 9

【 0 4 2 9 】

atgtaccatacgatgttccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcaaggctcgaagcgtccgaca
gaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgagtac
aagggtgccagcaagaaattcaagggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctg
atcggagccctgctgttcgacagcggcgaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccaga
agaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggcca
agggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccttctggtggaagaggataagaagcacga
gcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctac
cacctgagaaagaaactggtggacagcacaggacaaggccgacctgcggtgatctatctggccctgg
cccacatgatcaagttccggggccacttctgatcagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgt
ggacaagctgttcatccagctggtgacagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgcc
gcggtggtggacgccaaggccatcctgtctgcccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgat
cgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggctg
acccccaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaactgcagctgagcaaggacacct
acgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtagccgacctgttctggccgc
caagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaaacaccgagatcaccaggcc
cccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctct
cgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagatttcttcgaccagagcaagaacggctacgcc
ggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctggaaaaga

10

20

30

40

50

tggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggacct
 tcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcagga
 agatffffaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatccct
 actacgtgggcccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcggagaaa
 ccatcacccttggaaacttcgaggaagtgggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatcgagcg
 gatgaccaacttcgataagaacctgcccacgagaaggtgctgcccagcacagcctgctgtacgag
 tacttaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgcctt
 cctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtg
 aagcagctgaaagaggactacttcaagaaaaatcgagtgcctcgcactccgtggaaatctccggcgtgg
 aagatcggttcaacgcctccctgggacacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttc
 ctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgaggacag
 agagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaaagtgatgaagcagctg
 aagcggcggagatacaccggctggggcagggctgagccggaagctgatcaaccggcatccgggacaag
 cagtcgggcaagacaatcctggatttctgaagtccgacggccttcgccaacagaaaacttcatgcagct
 gatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccagggcgat
 agcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacag
 tgaaggtgggtggacgagctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaat
 ggccagagagaaccagaccaccagaaggggacagaagaacagccgagagagaatgaagcggatcg
 aagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgc
 agaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcccggatgtgtacgtggaccaggaactgga
 catcaaccggctgtccgactacgatgtggaccataatcgtgcctcagagcttctgaaggacgactccat
 cgacaacaagggtgctgaccagaagcagacaagaaccggggcaagagcagacaacgtgccctccgaaga
 ggtcgtgagaagatgagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccagagaaaag
 ttcgacaatctgaccaaggccgagagagggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaaga
 gacagctggtggaaaccggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactccgggatgaacac
 taagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctgggtg
 tccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgccacga
 cgcttacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcagattc
 gtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcagcagcaggaaatcggc
 aaggctaccgccaagtaacttcttctacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattaccctggcc
 aacggcagagatccggaagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaccggggagatcgtgtgggat
 aaggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgcccgaagtgaatatcgtgaaaaaga
 ccgaggtgcagacagggcggcttcagcaaaagagtctatcctgcccgaagaggaaacagcgataagctgat
 cgccagaaagaaggactgggaccttaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattct
 gtgctggtgggtggccaaagtggaaaagggaaggtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctg
 gggatcaccatcatggaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgacttctggaagccaagggt
 acaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtaactcctgttcgagctggaaaacgg
 ccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaa
 tatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagca
 gaaacagctgtttgtggaacagcacaaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcagattct
 ccaagagagtgatcctggccgacgctaactctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggga
 taagccatcagagagcagggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagccctg
 ccgcttcaagtaactttgacaccaccatcgaccggaaagaggtacaccagcaccaaaagaggtgctgga
 cgccacctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctggga
 ggcgacagcccaagaagaagagaaaggtggaggccagctaag (配列番号47)

【 0 4 3 0 】

合成ポリ A

【 0 4 3 1 】

Aattcaataaaagatctttatctttagatctgtgtgtttgtgtgctggcc (配列番号48)

【 0 4 3 2 】

3 ' I T R

【 0 4 3 3 】

Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccggggcga
ccaaaggtcgcccgcgcccgggctttgcccgggcgccctcagtgagcgagcgagcgcgag (配
列番号29)

【 0 4 3 4 】

全配列 p 1 4 9 8 __ p A A V __ H L P __ S p C a s 9 + U 6 3 ' m a l b __ g R N A (5 , 1 k b)

【 0 4 3 5 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCTGGGCGAC 10
CTTTGGTGCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCTTgtagttaatgattaaccgcatgctacttatctacgtagagctctt
gtcgaggtcgacatttaaataagggcgcaattcaatttgagggcctatcccattccttcatattt
gcatatacgatacaaggctgftagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagt
acaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaattg
gactatcataatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgttgaaaggacg
aacaccgctatttaataaggcagcagtggttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcc
gttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttgttttagagctagaaatagcaagttaaa
ataaggctagtccgttttttagcgcgctgcgccaattctgcagacaaatggctctagaggtaccaatttac
gtagctaagTGTGGCTGCTTGCAATGTTTGCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCT 20
GTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTT
TGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGT
TGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAG
CTTCAGGCACCACTGACCTGGGACAGTGAA Tcaccggtggtacctgcttttgctcgctt
ggatccccggtgccaccatgtaccatacgatgttccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcaag
gtcgaagcgtccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccactctgtgggctgggccc
tgatcaccgacgagtacaaggtgccagcaagaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacag
catcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgagggccaccggctg
aagagaaccgccaagaagaatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttca
gcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttccacagactggaagagtccttctggtggaaga 30
ggataagaagcacgagcggcaccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaa
gtacccaccatctaccacctgagaaagaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggtg
atctatctggccctggccacatgatcaagttccggggccacttctgatcgagggcgacctgaacc
cgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaa
aaccatcaacgcccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagac
ggctggaaaatctgatcggccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgc
cctgagcctgggctgacccccacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcag
ctgagcaaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgcc
acctgttctgggcccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaaacc
gagatcaccaggccccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctga 40
ccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaagagatcttctcgaccagagc
aagaacggctacgcccgtacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagc
ccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcg
gaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccatt
ctgcgggcggcaggaagatttttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctga
ccttccgcatcccctactacgtgggcccctctggccaggggaaacagcagattcgccctggatgaccaga
aagagcagggaaacctaccacctggaacttcgaggaagtgggtggacaaggcgcttccgcccag
agcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaagggtgctgcccgaagcaca
gcctgctgtacgagtaacttaccggtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaatg
agaaagcccgccttctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaacc 50

Tgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagagctcttgtcgaggctcgac (配列番号50)

【0440】

U6発現カセットs c R N A

【0441】

Ctgacctcgagtttcccatgattccttcatatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacacaagatattagtaacaaatcgtgacgtagaaagtaataatttcttggtagtttgcagttttaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgttggaaggacgaaacaccggactcgcgcgagtcgaggaggtttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcgggtctttttgttttagagctagaaatagcaag (配列番号51)

10

【0442】

H L P プロモーター

【0443】

TGTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAAT (配列番号46)

20

【0444】

s p C a s 9

【0445】

atgtaccatacgatgttccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcaaggctcgaagcgtccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgagtaaaaggtgccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggcaagggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccttccctgggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccctgagaaagaaactgggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttccctgatcgaaggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctgggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgcccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggctgacccccaaacttcaagagcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtagccgacctgtttctggccgccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaaaccgagatcaccaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgacctgagaagtagaaagagatttcttcgaccagagcaagaacggctacggcggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtgggcccctctggccaggggaaacagcagattcgccctggatgaccagaaagagcggaggaaacatcaccccctggaacttcgaggaagtggtggacaaggcgcttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccacgagaaggtgctgcccagcagcagcctgctgtacgagtacttaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagcccgcctcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttc

30

40

50

ctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacag
 agagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaaagtgatgaagcagctg
 aagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaag
 cagtccggcaagacaatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaaacttcatgcagct
 gatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccagggcgat
 agcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacag
 tgaaggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaat
 ggccagagagaaccagaccaccagaaagggacagaagaacagccgagagagaatgaagcggatcg
 aagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacaccagctgc
 agaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggggcgggatatgtacgtggaccaggaactgga
 catcaaccggctgtccgactacgatgtggaccataatcgtgcctcagagcttctgaaggacgactccat
 cgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaaga
 ggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccagagaaag
 ttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaaga
 gacagctggtggaaacccggcagatcacaagcacgtggcacagatcctggactccgggatgaacac
 taagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtg
 tccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgccacga
 cgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttc
 gtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggc
 aaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattaccctggcc
 aacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaaaacggcgaaacccggggagatcgtgtgggat
 aaggccgggattttgccaccgtgcggaagtgctgagcatgcccgaagtgaatatcgtgaaaaaga
 ccgaggtgcagacagggcggcttcagcaaaagagtctatcctgcccgaagaggaaacagcgataagctgat
 cgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattct
 gtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctg
 gggatcacatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgacttctggaagccaagggt
 acaaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtaactcctgttcgagctggaaaacgg
 ccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggcctgcccctccaaa
 tatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagca
 gaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttct
 ccaagagagtgatcctggccgacgctaactctggacaaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggga
 taagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaatctgggagcccctg
 ccgccttcaagtaactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaaagaggtgctgga
 cgccacctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctggga
 ggcgacagccccaagaagaagagaaaaggtggaggccagctaag (配列番号52)

【 0 4 4 6 】

合成ポリ A

【 0 4 4 7 】

Aattcaataaaaagatctttatcttattcattagatctgtgtgttgggtttttgtgtgctggcc (配列番号48)

【 0 4 4 8 】

3' I T R

【 0 4 4 9 】

Gcaggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccgggc
 gaccaaaggctgcccagcggcgggctttgccggggcggcctcagtgagcagcagcgcgcag (配列番号29)

【 0 4 5 0 】

全配列 p 1 5 0 0

【 0 4 5 1 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAAC

10

20

30

40

50

CCATCACTAGGGGTTCT

ttagttaaatagattaaccgccatgctacttatctacgtagagctcttgtcagaggtcgacctgacctcga
 gttcccatgattccttcatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattg
 actgtaaacacaaagatattagtaaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagttgca
 gtttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggct
 ttatatacttgttggaaggacgaaacaccggactcgcgcgagtcgaggaggtttttagagctagaaat
 agcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcgggtgctttttgttt
 agagctagaaatagcaagtctagaggtagcaatttacgtagctaagTGTTTGCTGCTTGCAATG
 TTTGCCCATTTTAGGGTGGACACAGGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACT 10
 CAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACC
 TTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAAT
 ACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGGA
 CAGTGAATcaccgggtggtacctgctttgctcgttggatccccggtgccaccatgtaccatacga
 tgttccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcgaaggtcgaagcgtccgacaagaagtacagcatc
 ggcttgacatcggcaccaactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacgagtaacaaggtgccagca
 agaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgct
 gttcgacagcggcgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccag
 acggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacgc
 ttcttccacagactggaagagtcttccctgggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatctt
 cggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaaccaccatctaccacctgagaaagaaa 20
 ctggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggtgatctatctggccctggcccacatgatcaagtt
 ccggggccacttctgatcagggcgacctgaaccccgacaacagcgcgagtggaacaagctgttcatc
 cagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaacccatcaacgccagcggcgtggacgcca
 aggccatcctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcggccagctgcccg
 cgagaagaagaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggctgaccccaacttcaaga
 gcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga
 caacctgctggccagatcggcgaccagtacgccgacctgttctggccgccaagaacctgtccgacg
 ccactctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgctctatg
 atcaagagatacgcagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgc
 ctgagaagtaaaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcgg 30
 agccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaa
 ctgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcc
 cccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagattttaccattctg
 aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttcgcctactacgtgggcccctctgg
 ccaggggaaacagcagattcgccctggatgaccagaaagagcgcgaggaaacctcaccctggaactt
 cgaggaagtgggtggacaagggcgcttccgccagagcttcatcgcgagcggatgaccaacttcgataag
 aacctgcccacgagaaggtgctgcccagcagcctgctgtacgagtaacttaccgctgtataacga
 gctgaccaaaagtgaatacgtgaccgagggaaatgagaaagcccgccttctgagcggcgcagcagaa
 aaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgacctgaaagcagctgaaagaggac
 tacttcaagaaaaatcgagtgttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctc 40
 cctgggacataaccagatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaaaac
 gaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgaggacagagagatgatcagggaac
 ggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcggagatacac
 cggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggcaagacaat
 cctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcc
 tgacctttaaaggagacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacat
 tgccaatctggccggcagccccgccattaagaaggccatcctgcagacagtgaaaggtgggtggacgag
 ctgctgaaagtgatgggcccggcacaagcccagagaacatcgtgatcgaatggccagagagaaccag
 accaccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagaggggcatcaaga
 gctgggacagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacaccagctgcagaacgagaagctgta 50

cctgtactacctgcagaatgggcgggatattgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtcc
gactacgatgtggaccataatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaagggtgct
gaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagat
gaagaactactggcggcagctgctgaacgccaaagctgattaccagagaaagtccgacaatctgacc
aaggccgagagagggcgccctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctgggtgaa
acccggcagatcacaagaacacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgaga
atgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaag
gatttccagttttacaaagtgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgc
cgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtacctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactac
aagggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaag
tacttcttctacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccgg
aagcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataaggccgggattttg
ccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacagg
cggcttcagcaaagagtctatcctgccccaaagaggaacagcgataagctgatcgccagaaagaaggac
tgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtgggtggcaa
agtggaaaagggaaggtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcacatcatgga
aagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggtacaaagaagtgaaaaag
gacctgatcatcaagctgcctaagttacctcctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggc
ctctgcccggcgaactgcagaagggaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttctgtacc
tggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtgga
acagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagtttccaagagagtgatcctg
gccgacgctaattctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagc
aggccgagaatatcatccacctgtttacctgaccaatctgggagccccctgccgcttcaagtactttg
acaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccacca
gagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggagggcgacagccccaagaag
aagagaaagggtggaggccagctaagaattcaataaaagatctttatttcattagatctgtgtgtgtgt
ttttgtgtgcggccgcaggaaccctagtgtgatggagttggccactccctctctgcgctcgcctcgtc
cactgaggccggggcgaccaaagggtcggccgacgcccgggctttgcccgggcgccctcagtgagcga
gagcagcgcgag (配列番号53)

10

20

【0452】

P1617__pTIGEM__HITI 3'mal b CodopV3 HITIドナー
5'ITR

30

【0453】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGTTCT (配列番号110)

【0454】

逆位gRNA+PAM部位

【0455】

GTATTTAATAGGCAGCAGTGTGG (配列番号54)

40

【0456】

合成スライシングアクセプター

【0457】

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (配列番
号21)

【0458】

mアルブミンエクソン14

【0459】

ggtccaaaccttgtcactagatgcaaagacgccttagcc (配列番号22)

【0460】

50

T 2 A 配列

【 0 4 6 1 】

Ggaagcggagagggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggacct (配列番号23)

【 0 4 6 2 】

C o d o p v 3

【 0 4 6 3 】

atgcagattgagctgagcacctgcttcttctgctgctgaggttctgcttctctgccaccaggaga
tactacctgggggctgtggagctgagctgggactacatgcagtctgacctgggggagctgacctgtgg
atgccaggttccccccagagtgcccaagagcttccccttcaacacctctgtggtgtacaagaagacc 10
ctgtttgtggagttcactgaccacctgttcaacattgccaaagcccaggccccctggatgggctgctg
ggccccaccatccaggctgaggtgtatgacactgtggtgatcacctgaagaacatggccagccacc
ctgtgagcctgcatgctgtgggggtgagctactggaaggcctctgagggggctgagtatgatgacca
gaccagccagaggggagaaggaggatgacaaggtgttccctgggggagccacacctatgtgtggca
ggtgctgaaggagaatggccccatggcctctgacccccctgtgcctgacctacagctacctgagccatg
tggacctggtgaaggacctgaactctggcctgattggggcctgctggtgtgcagggagggcagcct
ggccaaggagaagaccagacctgcacaagttcatcctgctgtttgctgtgtttgatgagggcaaga
gctggcactctgaaaccaagaacagcctgatgcaggacagggatgctgcctctgccagggcctggcc
caagatgcacactgtgaatggctatgtgaacaggagcctgcctggcctgattggctgccacaggaagt
ctgtgtactggcatgtgattggcatgggcaccaccctgaggtgcacagcatcttctggagggccac 20
accttctggtcaggaaccacaggcaggccagcctggagatcagccccatcaccttctgactgccca
gacctgctgatggacctgggccagttcctgctgttctgccacatcagcagccaccagcatgatggca
tggaggcctatgtgaaggtggacagctgccctgaggagccccagctgaggatgaagaacaatgagg
aggctgaggactatgatgatgacctgactgactctgagatggatgtggtgaggtttgatgatgacaac
agccccagcttcatccagatcaggtctgtggccaagaagcaccccaagacctgggtgcaactacattgc
tgcctgagggaggactgggactatgccccctgggtgctggccccctgatgacaggagctacaagagc
cagctacctgaacaatggccccagaggattggcaggaagtacaagaaggtcaggttcatggcctaca
ctgatgaaaccttcaagaccagggaggccatccagcatgagcttggcatcctgggccccctgctgtat
ggggaggtgggggacacctgctgatcatcttcaagaaccaggccagcagggcctacaacatctacc
cccatggcatcactgatgtgaggccccctgtacagcaggaggctgcccaagggggtgaagcacctgaa 30
ggacttccccatcctgcctggggagatcttcaagtacaagtggactgtgactgtggaggatggccccca
ccaagtctgaccccaggtgcctgaccagatactacagcagctttgtgaacatggagagggacctggc
ctctggcctgattggccccctgctgatctgctacaaggagtctgtggaccagaggggcaaccagatca
tgtctgacaagaggaatgtgatcctgttctctgtgtttgatgagaacaggagctggtacctgactgaga
acatccagaggttctgccccaccctgctggggtgcagctggaggacctgagttccaggccagca
catcatgcacagcatcaatggctatgtgtttgacagcctgcagctgtctgtgtgcctgcatgaggtggc
ctactggctacatcctgagcattggggcccagactgacttccctgtctgtgttcttctctggctacacctt
aagcacaagatgggtgtatgaggacacctgacctgttccccttctctggggagactgtgttcatgag
catggagaacctggcctgtggattctgggctgccacaactctgacttcaggaacaggggcatgactg
ccctgctgaaagtctccagctgtgacaagaacactggggactactatgaggacagctatgaggacatc 40
tctgcctacctgctgagcaagaacaatgccattgagcccaggagcttcagccagaatgccactaatgt
gtctaacaacagcaacaccagcaatgacagcaatgtgtctccccagtgctgaagaggcaccagagg
gagatcaccaggaccacctgcagtctgaccaggaggagattgactatgatgacaccatctctgtgga
gatgaagaaggaggactttgacatctacgacgaggacgagaaccagagccccaggagcttcagaa
gaagaccaggcactacttcatgtgctgtgagagggctgtgggactatggcatgagcagcagcccc
catgtgctgaggaacagggccccagctctggcctctgtgccccagttcaagaaggtgggtgttccaggagt
cactgatggcagcttcaaccagccccctgtacagaggggagctgaatgagcacctgggctgctgggc
ccctacatcagggctgaggtggaggacaacatcatggtgaccttcaggaaccaggccagcagggcct
acagcttctacagcagcctgatcagctatgaggaggaccagagggcagggggctgagcccaggaaga
actttgtgaagcccaatgaaaccaagacctacttctggaaggtgcagcaccacatggccccaccaag 50

gatgagtttgactgcaaggcctgggcctacttctctgatgtggacctggagaaggatgtgcactctgg
 cctgattggccccctgctgggtgtgccacaccaacacctgaacctgcccattggcaggcagggtgactg
 tgcaggagtttgccctgttcttcaccatctttgatgaaaccaagagctggtacttcaactgagaacatgg
 agaggaactgcagggccccctgcaacatccagatggaggacccccaccttcaaggagaactacaggtt
 ccatgccatcaatggctacatcatggacacctgcctggcctgggtgatggcccaggaccagaggatca
 ggtggtacctgctgagcatgggcagcaatgagaacatccacagcatccacttctctggccatgtgttc
 actgtgaggaagaaggaggagtacaagatggccctgtacaacctgtacctgggggtgtttgagactgt
 ggagatgctgcccagcaaggctggcatctggaggggtggagtgcctgattggggagcacctgcatgct
 ggcatgagcacctgttccctgggtgtacagcaacaagtgccagacccccctgggcatggcctctggcca
 catcagggacttccagatcactgcctctggccagtatggccagtggggcccccaagctggccaggctgc
 actactctggcagcatcaatgcctggagcaccaaggagcccttcagctggatcaaggtggacctgctg
 gccccatgatcatccatggcatcaagaccagggggccaggcagaagttcagcagcctgtacatca
 gccagttcatcatcatgtacagcctggatggcaagaagtggcagacctacaggggcaacagcactgg
 cacctgatgggtgttctttggcaatgtggacagctctggcatcaagcacaacatcttcaaccccccat
 cattgccagatacatcaggctgcacccccaccactacagcatcaggagcacctgaggatggagctg
 atgggctgtgacctgaacagctgcagcatggccctgggcatggagagcaaggccatctctgatgcc
 agatcactgccagcagctacttcaccaacatgtttgccacctggagccccagcaaggccaggctgcac
 ctgcagggcaggagcaatgcctggagggccccagggtcaacaacccccaggagtggctgcaggtggac
 ttccagaagaccatgaagggtgactgggggtgaccacccaggggggtgaagagcctgctgaccagcatgt
 atgtgaaggagtctctgatcagcagcagccaggatggccaccagtggacctgttcttcagaatggc
 aagggtgaagggtgttccagggcaaccaggacagcttcacccctgtggtgaacagcctggaccccccc
 tgctgaccagatacctgaggattcacccccagagctgggtgcaccagattgcctgaggatggaggt
 gctgggctgtgaggcccaggacctgtac (配列番号55)

【 0 4 6 4 】
 3 X F L A G
 【 0 4 6 5 】

GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGA
 CGATGACAAGTGA (配列番号56)

【 0 4 6 6 】
 合成ポリA
 【 0 4 6 7 】

Tcgcgaaataaaagatctttatcttcattagatctgtgtgttggtttttgtgtgatgcagc (配列番号37)

【 0 4 6 8 】
 逆位 g R N A および P A M
 【 0 4 6 9 】

gtatttaataggcagcagtggtg (配列番号54)

【 0 4 7 0 】
 追加の A A V 配列
 【 0 4 7 1 】

GAGCTCTTGTCGAGGTCGACATTTAAATGAATTCCAATTG (配列番号57)

【 0 4 7 2 】
 3 ' i t r
 【 0 4 7 3 】

Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcactgaggccggggcga
 ccaaaggctgcccagcggccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcagcagcagcgcgcag (配
 列番号29)

【 0 4 7 4 】
 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAAC

10

20

30

40

50

CCATCACTAGGGGTTCTGctagcGTATTTAATAGGCAGCAGTGTGGGATAGGCACC
 TATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGggtccaaacctgtcacta
 gatgcaaagacgccttagccggaagcggagagggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcg
 aggagaatcctggacctatgcagattgagctgagcacctgcttcttctgtgacctgctgaggttctgct
 tctctgccaccaggagatactacctgggggctgtggagctgagctgggactacatgcagtctgacctg
 ggggagctgacctgtggatgccagggttccccccagagtgcccaagagcttccccctcaacacctctgt
 ggtgtacaagaagacctgtttgtggagttcactgaccacctgttcaacattgccaagcccaggcccc
 cctggatgggcctgctgggccccaccatccaggctgaggtgtatgacactgtgggtgatcacctgaag
 aacatggccagccacctgtgagcctgcatgctgtgggggtgagctactggaaggcctctgaggggg
 ctgagtatgatgaccagaccagccagagggagaaggaggatgacaagggtgttccctgggggacagcc
 acacctatgtgtggcagggtgctgaaggagaatggccccatggcctctgacccccctgtgacctgaccta
 agctacctgagccatgtggacctggtgaaggacctgaactctggcctgattggggccctgctggtgtg
 cagggagggcagcctggccaaggagaagaccagacctgcacaagttcatcctgctgtttgctgtgt
 ttgatgagggcaagagctggcactctgaaaccaagaacagcctgatgcaggacagggatgctgcctc
 tggcagggcctggcccaagatgcacactgtgaatggctatgtgaacaggagcctgacctggcctgattg
 gctgccacaggaagtctgtgtactggcatgtgattggcatgggcaccacccccctgaggtgcacagcatc
 ttctggagggccacaccttctggtcaggaaccacaggcaggccagcctggagatcagccccatca
 ccttctgactgccagacctgctgatggacctgggcccagttcctgctgttctgccacatcagcagcc
 accagcatgatggcatggaggcctatgtgaagggtggacagctgacctgaggagccccagctgaggat
 gaagaacaatgaggaggctgaggactatgatgatgacctgactgactctgagatggatgtggtgagg
 tttgatgatgacaacagccccagcttcatccagatcaggtctgtggccaagaagcaccccaagacctg
 ggtgcactacattgctgctgaggaggaggactgggactatgccccctggtgctggccccctgatgaca
 ggagctacaagagccagttacctgaacaatggccccccagaggattggcaggaagtacaagaaggta
 ggttcatggcctacactgatgaaacctcaagaccagggaggccatccagcatgagtctggcatcctg
 ggccccctgctgtatggggagggtgggggacacacctgctgatcatcttcaagaaccaggccagcaggg
 cctacaacatctacccccatggcatcactgatgtgaggccccctgtacagcaggaggctgccccaggg
 ggtgaagcacctgaaggacttccccatcctgacctggggagatcttcaagtacaagtggactgtgactg
 tggaggatggccccaccaagtctgacccccaggtgacctgaccagatactacagcagctttgtgaacatg
 gagagggacctggcctctggcctgattggccccctgctgatctgctacaaggagtctgtggaccagag
 gggcaaccagatcatgtctgacaagaggaatgtgatcctgttctctgtgtttgatgagaacaggagct
 ggtacctgactgagaacatccagagggttctgccccacacctgctgggggtgcagctggaggacctga
 gttccaggccagcaacatcatgcacagcatcaatggctatgtgtttgacagcctgcagctgtctgtgtg
 cctgcatgaggtggcctactgggtacatcctgagcattggggcccagactgacttctgtctgtgttctt
 ctctggctacaccttcaagcacaagatgggtgatgaggacacctgacctgttcccccttctctgggga
 gactgtgttcatgagcatggagaacctggcctgtggattctgggctgccacaactctgacttcagga
 acaggggcatgactgcctgctgaaagtctccagctgtgacaagaacactggggactactatgagga
 cagctatgaggacatctctgcctacctgctgagcaagaacaatgccattgagcccaggagcttcagcc
 agaatgccactaatgtgtctaaacaacagcaacaccagcaatgacagcaatgtgtctccccagtgctg
 aagaggcaccagagggagatcaccaggaccacctgcagctctgaccaggaggagattgactatgatg
 acaccatctctgtggagatgaagaaggaggactttgacatctacgacgaggacgagaaccagagccc
 caggagcttccagaagaagaccaggcactacttcttctgctgtgtggagaggctgtgggactatggca
 tgagcagcagccccatgtgctgaggaacagggcccagctctggctctgtgccccagttcaagaaggt
 ggtgttccaggagttcactgatggcagcttccaccagccccctgtacagagggggagctgaatgagcacc
 tgggacctgctgggccccctacatcagggtgaggtggaggacaacatcatggtgaccttcaggaacca
 ggccagcagggcctacagcttctacagcagcctgatcagctatgaggaggaccagaggcagggggct
 gagcccaggaagaactttgtgaagcccaatgaaaccaagacctacttctggaagggtgcagcaccaca
 tggccccaccaaggatgagtttgactgcaaggcctgggaccttctctgatgtggacctggagaag
 gatgtgcactctggcctgattggccccctgctggtgtgccacaccaacacctgaacctgcccattgg
 caggcaggtgactgtgcaggagtttgcctgttcttccacctctttgatgaaaccaagagctggtactt
 cactgagaacatggagaggaactgcagggccccctgcaacatccagatggaggacccccaccttcaag

10

20

30

40

50

gagaactacaggttccatgccatcaatggctacatcatggacaccctgcctggcctggatggccca
 ggaccagaggatcaggtggtacctgctgagcatgggcagcaatgagaacatccacagcatccacttc
 tctggccatgtgttcaactgtgaggaagaaggaggagtacaagatggccctgtacaacctgtaccctgg
 ggtgtttgagactgtggagatgctgcccagcaaggctggcatctggaggggtggagtgcctgattggg
 gagcacctgcatgctggcatgagcacctgttctctgggtgtacagcaacaagtgccagacccccctggg
 catggcctctggccacatcagggacttccagatcactgcctctggccagtatggccagtgggccccca
 agctggccaggctgcactactctggcagcatcaatgcctggagcaccaaggagcccttcagctggatc
 aaggtggacctgctggcccccatgatcatccatggcatcaagaccaggggggccaggcagaagtcca
 gcagcctgtacatcagccagttcatcatgtacagcctggatggcaagaagtggcagacctacagg
 ggcaacagcactggcacctgatgggtgttctttggcaatgtggacagctctggcatcaagcacaacat
 cttcaacccccccatcattgccagatacatcaggctgcacccccaccactacagcatcaggagcacc
 tgaggatggagctgatgggctgtgacctgaacagctgcagcatgccccctgggcatggagagcaaggc
 catctctgatgcccagatcactgccagcagctacttccaacaacatgtttgccacctggagccccagca
 aggccaggctgcacctgcagggcaggagcaatgcctggaggccccagggtcaacaacccccaggagt
 ggctgcaggtggacttccagaagaccatgaaggtgactgggggtgaccaccaggggggtgaagagcc
 tgctgaccagcatgtatgtgaaggagtccctgatcagcagcagccaggatggccaccagtggacct
 gttcttccagaatggcaaggtgaaggtgttccagggcaaccaggacagcttccccctgtggtgaaca
 gcctggacccccccctgctgaccagatacctgaggattccccccagagctgggtgaccagattgcc
 ctgaggatggaggtgctgggctgtgaggcccaggacctgtacGACTACAAAGACCATGACGGT
 GATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGTGAtcgcgaataa
 aagatctttattttcattagatctgtgtgttgggtttttgtgtgatgcagcgtatttaataggcagcagt
 tggGAGCTCTTGTGCGAGGTCGACATTTAAATGAATTCCAATTGaggaaccctagtgatg
 gagttggccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgac
 gcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgcgagcgcgcgag (配列番号58)

10

20

【0475】

< 上記実施例4の配列 >

【0476】

HIT I 3' ヒトALb

構築物 p939__pCbh-SpCas9(BB)-2A-GFP+スクランブルgRNA

30

【0477】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTTAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

【0478】

ヒトU6プロモーター

【0479】

Gactcgcgcgagtcgaggag (配列番号111)

40

【0480】

スクランブルRNA

【0481】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
 AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (配列番号60)

【0482】

キメラRNA足場

【0483】

cgttacataacttacggtaaattggcccgctggctgaccgccccaacgacccccgccattgacgtcaa
 tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacctgg

50

cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgct
 ggcaattgtgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgc
 tattaccatggtcagaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccc
 aattttgtattttatttttttaattttttgtgcagcgatggggggcgggggggggggggggggcgcgc
 gccagggcgggggcgggggcgggggcgagggggcgggggcgagggcgagaggtgcggcgggcagcc
 aatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaa
 agcgaagcgcgcggcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgc
 gcctcgcgcccgcccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggggcgggacggcc
 ctctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaagggtttaagggatggttggttgggtggggtat
 taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttg (配列番号61)

10

【0484】

CBHプロモーター

【0485】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
 CGATGACGATAAG (配列番号62)

【0486】

3Xフラッグタグ

【0487】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAAGAACC
 GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
 TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
 GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
 CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
 CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
 CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAGAGATTTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
 AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGAGGAAGATTTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCAACGACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG

20

30

40

50

GCGTGG AAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAG
 TGATGGGCCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTGCTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGGCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG

10

20

30

40

(配列番号112)

【0488】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

【0489】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
 TGGCCCA (配列番号63)

【0490】

50

Thosea Assigna ウイルス T2A スキッピングペプチド

【0491】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
 CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTG
 ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA (配列番
 号64)

10

【0492】

E G F P 融合タンパク質

【0493】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgt
 gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgca
 ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
 gaagagaatagcagggcatgctgggga (配列番号65)

20

【0494】

B G H ポリA

【0495】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

30

【0496】

3' ITR

【0497】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGgactcgcgcgagtcgaggagTTTTAGAGCTAGA
 AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT
 CGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT
 TTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactt
 acggtaaattgcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgcaa
 tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaag
 tgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgcctggcattgtgccc
 agtacatgaccttattgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggt
 cgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattta
 tttattttttaattttttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggggcgcgcgccaggcgggg
 cggggcggggcgaggggcggggcggggcgagggcgggagaggtgcggcgggcagccaatcagagcgg
 cgcgctccgaaagtttcttttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcg
 cgggcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccggcctcgcgcccg
 ccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgg

40

50

gctgtaattagctgagcaagaggtaaggggtttaaggggatggttgggtgggggtattaatgtttaatt
acctggagcacctgcctgaaatcactttttttcagggttgACCGGTGCCACCATGGACTATAAG
GACCACGACGGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAA
GATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACA
AGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCGGTGATC
ACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAG
CCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAAC
CGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAG
CTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGC 10
GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCG
GCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCG
AGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTG
CAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGC
CAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGC
CTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACT
GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCG
GCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTG 20
CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAGGCCCCCTGAGCGCCTC
TATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCG
TGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCAT
CAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACA
GAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAG
ATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTTACCCATT
CCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCATCCCCTACT
ACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGC
GAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC 30
CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACC
AAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCA
GAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCC
GGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAAT
TATCAAGGACAAGGACTTCTGACAAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATA
TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAA
ACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATA
CACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGT 40
CCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCA
GGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCC
CCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAA
GTGATGGGCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGG
GCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAG
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGT
GGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGC
CTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGAC 50

AAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAA
 GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACA
 ATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATC
 AAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGA
 CTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAG
 TGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAAGGATTTCCAGTTTTAC
 AAAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
 CGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG
 GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATC
 GGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC 10
 CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACG
 GCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAA
 GTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGG
 CTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAA
 AGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAT
 TCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGT
 GAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCA
 TCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAG
 CTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTC
 TGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACT 20
 TCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAG
 CAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA
 GATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGC
 TGTCCGCTACAACAAGCACCCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC
 ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGAC
 ACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
 GAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG
 GAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTTCGAGGA
 GAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCC 30
 TGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
 GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
 GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCT
 TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
 GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
 CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTAC
 AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
 CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC 40
 AGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTG
 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT
 GCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG
 AATTCTAAActagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctggtggttggc
 cctccccctgaccttcttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaa
 ttgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggg
 gaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 CTGCCTGCAGG (配列番号67)

【 0 4 9 8 】

10

20

30

40

50

構築物 p 1 5 2 6 _ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミン g R N A 1

【 0 4 9 9 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

【 0 5 0 0 】

ヒトU6プロモーター

【 0 5 0 1 】

Aatctctggacggaagctca (配列番号10)

【 0 5 0 2 】

g R N A 1 ヒトアルブミン

【 0 5 0 3 】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (配列番号60)

【 0 5 0 4 】

キメラRNA足場

【 0 5 0 5 】

Cgttacataacttacggtaaatggcccgctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaa
tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttgg
cagtaacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgct
ggcattgtgcccagtaacatgaccttatgggactttcctacttggcagtaacatctacgtattagtcacgc
tattaccatggctcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccccctccccaccccc
aattttgtattttattttatttttaattttttgtgacgcatgggggcgggggggggggggggggcgcgcg
gccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgagggcgagaggtgcggcgggcagcc
aatcagagcgggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcgggcgggcgggcgggccctataaaa
agcgaagcgcgcgggcggggagtcgctgacgctgccttcgccccgtccccgctccgcccgc
gcctcgcgccgcccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggacggcc
cttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaagggttaagggtggttggtggggtat
taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcacttttttcaggttg (配列番号61)

【 0 5 0 6 】

C B H プロモーター

【 0 5 0 7 】

ATGGACTATAAGGACACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
CGATGACGATAAG (配列番号62)

【 0 5 0 8 】

3 X フラッグタグ

【 0 5 0 9 】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA

10

20

30

40

50

GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
AAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAG
AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTC
CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGCATCCCCTACTA
CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
AGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGGT
GCTGCCAACGACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
AAGTGAAATACGTGACCGAGGGAAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAG
AAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
ATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCAG
GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGGCGGGATATGTACGTG
GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
AGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAAGGATTTCCAGTTTTACA
AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCAGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
GAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGCACCGTGCGGAAAG
TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC

10

20

30

40

50

TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG
 (配列番号68)

10

【0510】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

【0511】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
 TGGCCCA (配列番号63)

20

【0512】

Those a s i g n a ウイルスT2Aスキッピングペプチド

【0513】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
 CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
 ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

30

【0514】

E G F P 融合タンパク質

【0515】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccccctccccgt
 gccttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgca
 ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
 gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

40

【0516】

B G H ポリ A

【0517】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

50

【 0 5 1 8 】

3 ' I T R

【 0 5 1 9 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA
ATGGACTIONCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGaatctctggacggaagctcaGTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT 10
CGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT
TTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCggttacataactt
acggtaaattggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgcaa
tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaag
tgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgcctggcattgtgccc
agtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggt
cgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattta
tttattttttaattttttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggggggcgcgcgccaggcgggg
cggggcggggcgaggggcggggcggggcgagggcgagaggtgcgggcgccagccaatcagagcg
cgcgctccgaaagtttcttttatggcgagggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcg
cgggcggggagtcgctgcgacgctgacctgccccgctgccccgctccgcccgcctcgcgcccg 20
ccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctcctccgg
gctgtaattagctgagcaagaggttaagggtttaagggatggttggttggtggggtattaatgtttaatt
acctggagcacctgctgaaatcacttttttcaggttgACCGGTGCCACCATGGACTATAAG
GACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAA
GATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACA
AGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATC
ACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAG
CCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAAC
CGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAG 30
CTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGC
GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCG
GCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCCCTGATCG
AGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTG
CAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGGCTGGACGC
CAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGC
CTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACT
GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCG 40
GCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTG
CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTC
TATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCG
TGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCAT
CAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACA
GAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATT
CCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCATCCCTACT
ACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGC 50

GAGGAAACCATCACCCCCTGGA ACTTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC
CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACC
AAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTTGAGCGGGCGAGCA
GAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCC
GGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAGATCTGCTGAAAAT
TATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATA
TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAAACGGCTGAAA
ACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATA 10
CACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGT
CCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCA
GGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCC
CCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAA
GTGATGGGCGGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGG
GCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAG
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGT
GGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGC 20
CTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGAC
AAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACA
ATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAAGGCCGGCTTCATC
AAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGA
CTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAG
TGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTAC
AAAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
CGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATC 30
GGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC
CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACG
GCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAA
GTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGGCGG
CTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAA
AGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAT
TCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGT
GAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCA
TCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGA AAAAGGACCTGATCATCAAG
CTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTC 40
TGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACT
TCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAG
CAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA
GATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGC
TGTCCGCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC
ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGAC
ACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
GAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG
GAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGA 50

gcctcgcgccgccccgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcgggaggacggcc
cttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggtaagggttaagggatggttggttgggtggggtat
taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttg

【 0 5 2 8 】

C B H プロモーター

【 0 5 2 9 】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
CGATGACGATAAG (配列番号62)

【 0 5 3 0 】

3 X フラッグタグ

【 0 5 3 1 】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
TGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAG
AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTTACCCATTC
CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTGCTGCTGGATGACCAGAAAGAGCG
AGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCAGATCTGCTGAAAATT
ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAAATTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG

10

20

30

40

50

GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAG
TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACA
AAGTGCGCGAGATCAACAACACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACC
GAGATTACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTG
ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG

10

20

30

(配列番号70)

【0532】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

【0533】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
TGGCCCA (配列番号63)

40

【0534】

Those a A s i g n a ウイルス T 2 A スキッピングペプチド

【0535】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
TGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC

50

AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGGCAGGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
 ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

【 0 5 3 6 】

E G F P 融合タンパク質

10

【 0 5 3 7 】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgtttgccccctccccgt
 gccttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgca
 ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
 gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

【 0 5 3 8 】

B G H ポリ A

【 0 5 3 9 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

20

【 0 5 4 0 】

3 ' I T R

【 0 5 4 1 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGacagtatggcacaatagagcGTTTTAGAGCTAGA
 AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT
 CGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT
 TTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactt
 acggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgcaa
 tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaag
 tgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgcctggcattgtgcc
 agtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggt
 cgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattta
 tttattttttaattttttgtgacgagatgggggcgggggggggggggggggcgcgccaggcgggg
 cggggcggggagggggcggggagggcggggagggcggggagggcgggcagccaatcagagcgg
 cgcgctccgaaagtttcttttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcg
 cgggcgggcgggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcctcgcgcccg
 ccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctcgg
 gctgtaattagctgagcaagaggtaagggtttaagggatggttgggtgggttattaatgtttaatt
 acctggagcacctgcctgaaatcacttttttcagggttgACCGGTGCCACCATGGACTATAAG
 GACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAA
 GATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACA
 AGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATC
 ACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
 GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAG
 CCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAAC

30

40

50

CGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAG
CTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGC
GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCG
GCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTTCCTGATCG
AGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTG
CAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGGCTGGACGC
CAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCG
CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGC
CTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACT 10
GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCG
GCGACCAGTACGCCGACCTGTTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTG
CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCTC
TATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAAGCTCTCG
TGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC
GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCAT
CAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACA
GAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCCAG
ATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATT
CCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGCATCCCCTACT 20
ACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCTGGATGACCAGAAAGAGC
GAGGAAACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC
CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACC
AAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGGCAGCA
GAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCC
GGCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAAT
TATCAAGGACAAGGACTTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATA
TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAA 30
ACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATA
CACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGT
CCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCA
GGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCC
CCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAA
GTGATGGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGG
GCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAG
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGT 40
GGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGC
CTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGAC
AAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACA
ATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATC
AAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGA
CTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAG
TGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTAC
AAAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT
CGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG 50

GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATC
 GGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC
 CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACG
 GCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAA
 GTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGG
 CTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAA
 AGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAT
 TCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGT
 GAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCA
 TCGACTTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTAAAAAGGACCTGATCATCAAG
 CTGCCTAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTC
 TGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACT
 TCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAG
 CAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA
 GATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGC
 TGTCCGCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC
 ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGAC
 ACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
 GAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG
 GAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGA
 GAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCC
 TGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
 GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
 GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGT
 TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
 GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
 CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTAC
 AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
 CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTG
 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT
 GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG
 AATTCTAAActagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtggccagccatctggtggttggc
 cctcccccgctgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaa
 ttgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggg
 gaggattgggaagagaaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 CTGCCTGCAGG (配列番号71)

10

20

30

40

【0542】

構築物 p 1 5 3 1 __ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミ
 ン g R N A 3

【0543】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

50

【 0 5 4 4 】

ヒトU6プロモーター

【 0 5 4 5 】

Acactacataacgtgatgag (配列番号13)

【 0 5 4 6 】

gRNA3ヒトアルブミン

【 0 5 4 7 】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (配列番号60)

【 0 5 4 8 】

キメラRNA足場

【 0 5 4 9 】

cgttacataacttacggtaaattggcccgccctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaa
tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttgg
cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgct
ggcattgtgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgc
tattacatggctcgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccc
aattttgtattttatttttttaattttttgtgcagcgatggggggcggggggggggggggggggcgcgc
gccaggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggcggggc
aatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
agcgaagcgcgcgggcggggcggggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtccccgctccgcccgc
gcctcgcgcccggccggcctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggggcggggcggggcggggc
cttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaaggggttaagggatggttggttggtggggat
taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttg

10

20

【 0 5 5 0 】

CBHプロモーター

【 0 5 5 1 】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
CGATGACGATAAG (配列番号62)

【 0 5 5 2 】

3Xフラッグタグ

【 0 5 5 3 】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGATATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGGCAAAACAGC
CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCAGCAGAAAGATAACACAGACGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT

30

40

50

ATGATCAAGAGATACGACGAGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
AAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAAGCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGCAGGAAGATTTTTACCCATTC
CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
AGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT 10
GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
GCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA 20
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
TGATGGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG 30
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
GAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG 40
CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTG
AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACCTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGC 50

AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAG

(配列番号72)

【0554】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

10

【0555】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
 TGGCCCA (配列番号63)

【0556】

Those a A s i g n a ウイルスT2Aスキッピングペプチド

【0557】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
 CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTG
 ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

20

【0558】

30

E G F P 融合タンパク質

【0559】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgt
 gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgca
 ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
 gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

【0560】

B G H ポリ A

【0561】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
 GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

40

【0562】

3' I T R

【0563】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGacactacataacgtgatgagGTTTTAGAGCTAGA

50

TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAA
ACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATA
CACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGT
CCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTC
ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCA
GGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCC
CCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAA
GTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
GACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGG
GCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAG 10
CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGT
GGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTG
CTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGAC
AAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAA
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACA
ATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAAGGCCGGCTTCATC
AAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGA
CTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAG
TGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTAC
AAAGTGC GCGAGATCAACA ACTACCACCGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT 20
CGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACG
GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATC
GGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC
CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACG
GCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAA
GTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGG
CTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAA
AGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAT
TCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGT
GAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCA 30
TCGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAG
CTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTC
TGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACT
TCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAG
CAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA
GATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGC
TGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAAGCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC
ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGAC
ACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTGCTGGACGCCACCCT
GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG 40
GAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAG
GAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGA
GAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCC
TGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGT
TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTAC 50

AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
 CTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTG
 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT
 GCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG
 AATTCTAAActagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcc
 cctcccccgctgccttccttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaa
 ttgcatcgcatgtgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggg
 gaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 CTGCCTGCAGG (配列番号73)

10

【0564】

構築物 p 1 5 3 2 __ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミン
 g R N A 4

【0565】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

20

【0566】

ヒトU6プロモーター

【0567】

Aaatagtttagaatagtggt (配列番号14)

【0568】

g R N A 4 ヒトアルブミン

【0569】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
 AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (SEQID NO:60)

30

【0570】

キメラRNA足場

【0571】

cgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaa
 tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaacgcccacttgg
 cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcct
 ggcatgtgcccagttacatgacctatgggactttcctacttggcagttacatctacgtatttagtcatcgc
 tattacatggctcagaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccaccccc
 aattttgtattttatttttttaattattttgtgcagcgtatggggggcgggggggggggggggcgcg
 gccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcgagggcgagagggtgcggcgggcagcc
 aatcagagcgggcgctccgaaagtcttttatggcgaggcgggcgggcgggcgccctataaaa
 agcgaagcgcgggcggggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgc
 gcctcgcgcccggcccggctctgactgaccgcttactcccacagggtgagcggggcgggacggcc
 ctctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaagggatggttggttgggtggggtat
 taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttg

40

【0572】

C B H プロモーター

【0573】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
 CGATGACGATAAG (配列番号62)

50

【 0 5 7 4 】

3 X フラッグ タグ

【 0 5 7 5 】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGATATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGGCGAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGGAAGAACC
 GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
 TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCTTCTGCTGGTGGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG 10
 GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
 CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
 CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
 CCAGCTGCCCGGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC 20
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
 AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGA AACCATCACCCCTGGA ACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC 30
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCAACGACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGGCAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAA
 CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC 40
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
 TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA 50

AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCTGAAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG

(配列番号109)

【0576】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

【0577】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
 TGGCCCA (配列番号63)

【0578】

Those a A s i g n a ウイルス T 2 A スキッピングペプチド

【0579】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
 CGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
 CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
 ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

10

20

30

40

50

【 0 5 8 0 】

E G F P 融合タンパク質

【 0 5 8 1 】

Ctagagctcgcctgatcagcctcgcactgtgccttctagttgccagccatctggtgtttgcccctccccgt
gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

【 0 5 8 2 】

B G H ポリ A

【 0 5 8 3 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

10

【 0 5 8 4 】

3 ' I T R

【 0 5 8 5 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGaaatagtttagaatagtggTTTTTAGAGCTAGAA
ATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTC
GGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTT
TTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactta
cggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgccaat
agggactttccattgacgtcaatgggtggagtattttacggtaaacctgccacttggcagtaacatcaagt
gtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattgtgccc
gtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtaacatctacgtattagtcacgctattacatggtc
gaggtgagccccacgttctgcttccactctccccatctccccccccctcccccccccaattttgtatttat
ttattttttaattttttgtgacgagatgggggccccgggggggggggggggggggccccgagggcggggc
ggggcggggagggggcgggggcggggagggcgagaggtgcgggcgagccaatcagagcggc
gcgctccgaaagtttccttttatggcgagggcgggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcgc
ggcgggcgggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccggcctcgcgcccgc
cggccccggtctgactgaccggttactcccacaggtgagcggggcgggacggccccttctcctccggg
ctgtaattagctgagcaagaggtaagggtttaagggatggttgggtgggggtattaatgtttaatta
cctggagcacctgcctgaaatcacttttttcaggttggACCGGTGCCACCATGGACTATAAGG
ACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAG
ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGATCCACGGAGTCCAGCAGCCGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACC GCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC

20

30

40

50

CCAGCTGCCCGGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTCCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAGAGATTTTCTTCCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
 AAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGCAGGAAGATTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCACCTGTTCCGACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
 TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGGCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTG

10

20

30

40

50

AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG
ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAGG
AATTCGGCAGTGGAGAGGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAG
AATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCT
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGCTT
CAGCCGCTACCCCGACCCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG
CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACA
ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
GCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGA
GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
CTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGA
ATTCTAAActagagctcgcctgatcagcctcgactgtgccttctagtggccagccatctgttgtttgcc
ctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaat
gcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaaggggg
aggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC
TGCCTGCAGG (配列番号74)

10

20

30

【0586】

構築物 p 1 5 5 6 __ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミ
ン g R N A 5

【0587】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

40

【0588】

ヒトU6プロモーター

【0589】

Gtgggctgtaatcatcgtct (配列番号16)

【0590】

gRNA5ヒトアルブミン

【0591】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA

50

AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (配列番号60)

【0592】

キメラRNA足場

【0593】

cgttacataacttacggtaaattggcccgccctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaa
tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttgg
cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgct
ggcattgtgcccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtattagtcacgc
tattacatggtcgagggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccccctccccaccccc
aattttgtattttatttttttaattattttgtgcagcgatggggggcggggggggggggggggggcgcgcg
gccaggcgggggcgggggcgggggcgaggggcgggggcgaggcgaggagaggtgcgggcgggcagcc
aatcagagcgggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcgggcgggcgggcgggccctataaaa
agcgaagcgcgggcgggggcggggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgc
gcctcgcgcccggcccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcggggcgggacggcc
cttctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaaggggttaagggatggttggttgggtggggtat
taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttg

10

【0594】

CBHプロモーター

【0595】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
CGATGACGATAAG (配列番号62)

20

【0596】

3Xフラッグタグ

【0597】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGGCGAAACAGC
CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCAGCCAGAAAGATAACACAGACGGAAGAACC
GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCTGCTGAAAGCTCTCGT
GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACG
GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCATC
AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAG
AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGCAGGAAGATTTTTTACCCATTC
CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG

30

40

50

AGGAAACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAG
 TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCTGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCAGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG

10

20

30

40

【 0 5 9 8 】

5 ' 核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3 ' 核局在化シグナル

【 0 5 9 9 】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
TGGCCCA (配列番号63)

【 0 6 0 0 】

T h o s e a A s i g n a ウイルス T 2 A スキッピングペプチド

【 0 6 0 1 】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA 10
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
TGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG 20
ACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

【 0 6 0 2 】

E G F P 融合タンパク質

【 0 6 0 3 】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgt
gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

【 0 6 0 4 】

B G H ポリ A

【 0 6 0 5 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

【 0 6 0 6 】

3 ' I T R

【 0 6 0 7 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAA 40
ATGGACTIONCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGgtgggctgtaatcatcgtctGTTTTAGAGCTAGAA
ATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC
GGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTT
TTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactta
cggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgccaat
agggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtaacatcaagt
gtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgcctggcattgtgccc
gtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtaacatctacgtattagtcacgtattaccatggtc
gagggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattat 50

ttatTTTTaattatTTTgtgcagcgatgggggcggggggggggggggggggcgcgccagggcggggc
 ggggcggggcgagggcggggcggggcgagggcggagaggtgcgggcgagccaatcagagcggc
 gcgctccgaaagtTtctTTTatggcgagggcggcgggcgggcggccctataaaaagcgaagcgcgc
 ggcgggcgggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcctcgcgcggcc
 cggccccggctctgactgaccggttactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctccggg
 ctgtaattagctgagcaagaggtaagggTTtaagggatggttggttggtgggggtattaatgtTTaatta
 cctggagcacctgcctgaaatcactTTTTTcaggttgACCGGTGCCACCATGGACTATAAGG
 ACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAG
 ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTC AAGGTGCTGGGCAACACCCGACCCG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGGCAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC
 GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
 TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGTTGGAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
 GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
 CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
 CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
 CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCCACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCATC
 AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
 TGATGGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG

10

20

30

40

50

ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCC GGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT 10
 GATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT 20
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA 30
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAGG
 AATTTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAG
 AATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTGCCCATCCT
 GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG
 CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTT
 CAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
 AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC 40
 CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG
 CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACA
 ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
 TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
 GCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGA
 GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
 CTGGAGTTCTGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGA
 ATTCTAAActagagctcgcctgatcagcctcgcactgtgccttctagttgccagccatctgtttgttggcc
 ctcccccgctgccttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaat
 gcatcgcatgtgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaaggggg 50

aggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC
TGCCTGCAGG (配列番号76)

【0608】

構築物 p 1 5 4 5 __ p T I G E M __ h A L B 3 ' H I T I ドナー (S A S __ a l b e x 1
3 __ e x 1 4 __ T 2 A __ d s R E D __ W P R E __ b G H p A)

【0609】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCAGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCCCT (配列番号110)

10

【0610】

5' - I T R

【0611】

CCACTCATCACGTTATGTAGTGT (配列番号77)

【0612】

ヒトアルブミンイントロン12の逆位 g R N A 配列 + P A M 配列

【0613】

Gataggcacctattggtcttactgacatccactttgcctttctctccacag (配列番号21)

【0614】

20

スプライシングアクセプター配列

【0615】

TGCACTTGTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAG
CTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAG
GAGACCTGCTTTGCCGAGGAG (配列番号78)

【0616】

エキソン13ヒトアルブミン

【0617】

Ggtaaaaaacttggtgctgcaagtcaagctgccttaggctta (配列番号79)

【0618】

30

エキソン14ヒトアルブミン

【0619】

GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCC
TGGACCT (配列番号23)

【0620】

Those a s i g n a ウイルス2A (T 2 A) スキッピングペプチド

【0621】

ATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGA
GGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCT
ACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTC
GCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCA
CCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGG
AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCC
CTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAAGTTCCTCC
CGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCC
TGTACCCCCGCGACGGCGTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAG
GGCGGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGT
GAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACG
AGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCCGCCACCACCTGTTC
CAGTAG

40

50

【 0 6 2 2 】

D i s c o s o m a R e d (D s R e d) コード配列

【 0 6 2 3 】

aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgfttgctccttttacgct
atgtggatacgcctgctttaaagcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcct
gtataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagtgtggtggcccgtgtgcaggcaacgtggcgtggtgtg
cactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggac
tttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgcctgctggacagg
ggctcggctgtttgggcaactgacaattccgtggtgtttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggtgct
cgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagc
ggaccttcttccccgcgccctgctgcccggctctgcccgtcttccgcgtcttcg

10

【 0 6 2 4 】

ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (W P R E)

【 0 6 2 5 】

gcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgtttgccctcccccgctgccttcccttgaccctgg
aagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggtgtc
attctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggc
atgctgggga (配列番号26)

【 0 6 2 6 】

ウシ成長ホルモンポリ A (B G H p A)

20

【 0 6 2 7 】

CCACTCATCACGTTATGTAGTGT (配列番号77)

【 0 6 2 8 】

ヒトアルブミンイントロン 1 2 の逆位 g R N A 配列 + P A M 配列

【 0 6 2 9 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAG (配列番号29)

【 0 6 3 0 】

3 ' - I T R

30

【 0 6 3 1 】

ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgacctttggtcgcc
cggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtggccaactccatcactaggggttctgcta
gtgctagcggcgcgccctctaCCACTCATCACGTTATGTAGTGTgataggcacctattggtctta
ctgacatccactttgcttttctctccacagTGCACTTGTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCA
AGGCAACAAAAGAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTGCGAGCTTTTGTAGAG
AAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAGggtaaaaaacttgt
tgctgcaagtcaagctgccttaggcttaGGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACA
TGCGGTGACGTGAGGAGAATCCTGGACCTATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAA
GCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCCG
AGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTG
CAGGTGACCAAGGGCGGCCCTGCCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTT
CCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGA
AGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGC
GGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCA
CGTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGA
CTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGCTGAAG
GGCGAGATCCACAAGGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGGCCACTACCTGGTGGAGTT
CAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGG
ACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTAC

40

50

GAGCGCGCCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAGgatccaatcaacctctggattacaa
 aatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgcttta
 tgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgt
 ctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcaactgtgtttgctgacgcaa
 cccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctat
 tgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcgcgtgctggacaggggctcggctgttgggcaactg
 acaattccgtgggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttggcacctggat
 tctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcct
 gctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgagatctgcctcgaactgtgccttctagttgccagccat
 ctgtttgtttgccccctccccctgcttcccttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaata
 aatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcagg
 acagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggaCCACTCATCACGTTATG
 TAGTGTAgctcttgtcgaggaattgAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT
 CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGG
 CTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (配列番号80)

10

【0632】

構築物 p 1 6 1 5 _ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミン
 gRNA6

【0633】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (配列番号59)

20

【0634】

ヒトU6プロモーター

【0635】

Tattggcagtcaaggccccg (配列番号17)

【0636】

gRNA6ヒトアルブミン

30

【0637】

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA
 AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT (配列番号60)

【0638】

キメラRNA足場

【0639】

cgttacataacttacggtaaattggcccgccctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaa
 tagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccaacttgg
 cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggccgcct
 ggcaattgtgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgc
 tattacatggctcagaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctccccccccctccccaccccc
 aattttgtattttatttttttaattttttgtgcagcgaatggggggcggggggggggggggggggcgcgc
 gccaggcggggcggggcggggcgaggggcggggcggggcgagggcgagaggtgcggcgggcagcc
 aatcagagcggcgcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcgggcgggccctataaaa
 agcgaagcgcgcggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgc
 gcctcgcgccgccccggcctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggacggcc
 ctctcctccgggctgtaattagctgagcaagaggttaagggttaagggatggttggttgggtggggat
 taatgtttaattacctggagcacctgcctgaaatcacttttttcagggttg

40

【0640】

CBH プロモーター

50

【 0 6 4 1 】

ATGGACTATAAGGACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGA
CGATGACGATAAG (配列番号62)

【 0 6 4 2 】

3 X フラッグタグ

【 0 6 4 3 】

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAGGTGCTGGGCAACACCCGACCGG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCAGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGGAAGAACC
 GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
 TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
 GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
 CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG
 CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
 CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCAACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
 AAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCCGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
 GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAG
 TGATGGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC

10

20

30

40

50

TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGA AAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAG

10

20

30

(配列番号81)

【0644】

5'核局在化シグナル + S p C a s 9 + 3'核局在化シグナル

【0645】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
 TGGCCCA (配列番号63)

【0646】

Those a A s i g n a ウイルスT2Aスキッピングペプチド

【0647】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
 CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
 CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
 TGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
 CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
 AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACG
 TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
 CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC

40

50

CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

【 0 6 4 8 】

E G F P 融合タンパク質

【 0 6 4 9 】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgtttgtttgccctccccgt
gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

10

【 0 6 5 0 】

B G H ポリ A

【 0 6 5 1 】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

【 0 6 5 2 】

3 ' I T R

【 0 6 5 3 】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGtattggcagtcaaggccccgGTTTTAGAGCTAGA
AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT
CGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT
TTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgcaa
tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaag
tgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaattggcccgcctggcattgtgcc
agtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgctattaccatggt
cgaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccccctccccaccccccaattttgtattta
tttattttttaattttttgtgacgagatgggggccccggggggggggggggggggcgcgccaggcgggg
cggggccccgggagggggccccggggcgagggcgagaggtgccccggcagccaatcagagcgg
cgcgctccgaaagtttcccttttatggcgaggcggcgggcgggcgccctataaaaagcgaagcgcg
cggcgggccccgagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcctcgcgccgc
ccgccccggctctgactgaccgcttactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctccgg
gctgtaattagctgagcaagaggtaagggtttaagggtggttgggtggggtattaatgtttaatt
acctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttggACCGGTGCCACCATGGACTATAAG
GACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAA
GATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCAGCAGCCGACA
AGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATC
ACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCG
GCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAG
CCGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAAC
CGGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAG
CTTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCCCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGC
GGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCC
ACCATCTACCACCTGAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCG
GCTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGGCCACTTCTGATCG

20

30

40

50

AGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTG
 CAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGGCGTGGACGC
 CAAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCG
 CCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAAACCTGATTGCCCTGAGC
 CTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACT
 GCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCG
 GCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTG
 CTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTC
 TATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCG
 TGCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC 10
 GGCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTTCAT
 CAAGCCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACTGCTCGTGAAGCTGAACA
 GAGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAG
 ATCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATT
 CCTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCGCGCATCCCTACT
 ACGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGC
 GAGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGC
 CCAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG
 TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACC
 AAAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGGCAGCA 20
 GAAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGC
 AGCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCC
 GCGGTGGAAAGATCGGTTCAACGCCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAAT
 TATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAAGATA
 TCGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAA
 ACCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATA
 CACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGT
 CCGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTC
 ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCCA
 GGTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCC 30
 CCGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAA
 GTGATGGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCA
 GACCACCAGAAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGG
 GCATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAG
 CTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGGATATGTACGT
 GGACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGC
 CTCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGAC
 AAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAA
 GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACA
 ATCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATC 40
 AAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGA
 CTCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAG
 TGATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTAC
 AAAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACTGAACGCCGT
 CGTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTTCGTGTACG
 GCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATC
 GGCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGAC
 CGAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACG
 GCGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAA
 GTGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGG 50

CTTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAA
 AGAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTAT
 TCTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGT
 GAAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCA
 TCGACTTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGGAAAAGGACCTGATCATCAAG
 CTGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTC
 TGCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACT
 TCCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAG
 CAGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA
 GATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGC 10
 TGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATC
 ATCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGAC
 ACCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTGCTGGACGCCACCCT
 GATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGG
 GAGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAG
 GAATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGA
 GAATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCC
 TGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
 GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAA
 GCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCT 20
 TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
 GAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGAC
 CCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 GCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTAC
 AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAA
 CTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACC
 AGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTG
 AGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCT
 GCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG
 AATTCTAAActagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtgccagccatctggtgtttgcc 30
 cctcccccgctgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaa
 ttgcatcgcatgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggg
 gaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGG
 AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAG
 GTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG
 CTGCCTGCAGG (配列番号82)

【0654】

構築物 p 1 6 1 6 __ p C b h - S p C a s 9 (B B) - 2 A - G F P + 3 ' ヒトアルブミ
 ン g R N A 7

【0655】

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
 AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
 GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
 ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
 ATCTTGTGGAAGGACGAAACACC (配列番号59)

【0656】

ヒトU6プロモーター

【0657】

Tcgaatgtattgtgacagag (配列番号18)

【0658】

TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTC
CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
AGGAAACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
GCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA
AAGTGAAATACGTGACCGAGGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
GCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
ATCAAGGACAAGGACTTCCCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
CGGCAAGACAATCCTGGATTTCCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCA
TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG
GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAG
TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
AGAACCAGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA
TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
GATCACCTGAAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACA
AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGG
CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACC
GAGATTACCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAG
TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTG
AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGC
AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG
ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG

10

20

30

40

50

ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAG
(配列番号19)

【0666】

5'核局在化シグナル+SpCas9+3'核局在化シグナル

【0667】

GGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC
TGGCCCA (配列番号63)

【0668】

Thosea AsignaウイルスT2Aスキッピングペプチド

10

【0669】

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCC
TGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCC
CGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA
GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACG
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGC
CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCC
CATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
ACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCTAA

20

【0670】

E G F P融合タンパク質

【0671】

Ctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccccctccccgt
gccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgg
gaagagaatagcaggcatgctgggga (配列番号65)

30

【0672】

BGHポリA

【0673】

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT
GAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (配列番号66)

【0674】

3'ITR

【0675】

40

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAG
AGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGT
GACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAATTTATGTTTTAAA
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATAT
ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTcgaatgtattgtgacagagGTTTTAGAGCTAGAA
ATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC
GGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTT
TTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCcgttacataactta
cggtaaatggcccgctggctgaccgcccacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgccaat
agggactttcattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttggcagfacatcaagt

50

gtatcatatgccaagtagcggccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattgtgccc
 gtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtagcatcgctattaccatggtc
 gaggtgagccccacgttctgcttcaactctccccatctccccccctccccaccccccaattttgattttat
 ttattttttaattattttgtgacgagatggggggcggggggggggggggggggggggcgcgcgagggcggggc
 gggggcggggcggggggcggggcggggcggggcggagaggtgaggcggcagccaatcagagcggc
 gcgctccgaaagtttccttttatggcgaggcggcggcggcggcggccctataaaaagcgaagcgcgc
 ggcggggcgggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccgcccgcgcctcgcgcggcc
 cgccccggctctgactgaccgcgttactcccacaggtgagcggggcgggacggcccttctcctccggg
 ctgtaattagctgagcaagaggtaagggttaagggatgggttggttgggtggttattaatgtttaatta
 cctggagcacctgcctgaaatcactttttttcaggttggACCGGTGCCACCATGGACTATAAGG 10
 ACCACGACGGAGACTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAG
 ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCGACAA
 GAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCA
 CCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGG
 CACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGC
 CGAGGCCACCCGGCTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACC
 GGATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGC
 TTCTTCCACAGACTGGAAGAGTCCTTCTGCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCG
 GCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCCA
 CCATCTACCACCTGAGAAAGAAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGG 20
 CTGATCTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGA
 GGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGC
 AGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAAAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCC
 AAGGCCATCCTGTCTGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGC
 CCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGAACCTGATTGCCCTGAGCC
 TGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAAACTG
 CAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGG
 CGACCAGTACGCCGACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGC
 TGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCT
 ATGATCAAGAGATACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGT 30
 GCGGCAGCAGCTGCCTGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTTCGACCAGAGCAAGAACG
 GCTACGCCGGCTACATTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATC
 AAGCCATCCTGGAAAAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAG
 AGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGA
 TCCACCTGGGAGAGCTGCACGCCATTCTGCGGGCGGCGAGGAAGATTTTTTACCCATTC
 CTGAAGGACAACCGGGAAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTA
 CGTGGGCCCTCTGGCCAGGGGAAAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCG
 AGGAAACCATCACCCCTGGAACTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCC
 CAGAGCTTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGT
 GCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCA 40
 AAGTGAAATACGTGACCGAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAG
 AAAAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCA
 GCTGAAAGAGGACTACTTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCG
 GCGTGGAAGATCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACATACCACGATCTGCTGAAAATT
 ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATAT
 CGTGCTGACCCTGACACTGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAA
 CCTATGCCACCTGTTTCGACGACAAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATAC
 ACCGGCTGGGGCAGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTC
 CGGCAAGACAATCCTGGATTTCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAAACTTCA
 TGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAGCCAG 50

GTGTCCGGCCAGGGCGATAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCC
 CGCCATTAAGAAGGGCATCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAG
 TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAG
 ACCACCCAGAAGGGACAGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGG
 CATCAAAGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGC
 TGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTG
 GACCAGGAACTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCC
 TCAGAGCTTTCTGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACA
 AGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCGTGAAGAAGATGAAG
 AACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTCGACAA 10
 TCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCA
 AGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGAC
 TCCCGGATGAACACTAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGT
 GATCACCCCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGGAAGGATTTCCAGTTTTACA
 AAGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTC
 GTGGGAACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCTGTGTACGG
 CGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCG
 GCAAGGCTACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACC
 GAGATTACCCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGG
 CGAAACCGGGGAGATCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGGCACCGTGCGGAAAG 20
 TGCTGAGCATGCCCAAGTGAATATCGTGAAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGC
 TTCAGCAAAGAGTCTATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAA
 GAAGGACTGGGACCCTAAGAAGTACGGCGGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATT
 CTGTGCTGGTGGTGGCCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAAACTGAAGAGTGTG
 AAAGAGCTGCTGGGGATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCAT
 CGACTTTCTGGAAGCCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAAGGACCTGATCATCAAGC
 TGCCTAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCT
 GCCGGCGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCCAAATATGTGAACTT
 CCTGTACCTGGCCAGCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGATAATGAGC
 AGAAACAGCTGTTTGTGGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAG 30
 ATCAGCGAGTTCTCCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCT
 GTCCGCCTACAACAAGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCA
 TCCACCTGTTTACCCTGACCAATCTGGGAGCCCTGCCGCCTTCAAGTACTTTGACA
 CCACCATCGACCGGAAGAGGTACACCAGCACCAAAGAGGTTGCTGGACGCCACCCTG
 ATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACACGGATCGACCTGTCTCAGCTGGG
 AGGCGACAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAGG
 AATTCGGCAGTGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAG
 AATCCTGGCCCAGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCT
 GGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
 AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAG 40
 CTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGCTT
 CAGCCGCTACCCCGACCAACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCG
 AAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACC
 CGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGG
 CATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACA
 ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAC
 TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCA
 GCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGA
 GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTG
 CTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGA 50

ATTCTAAActagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgccc
 ctccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaat
 gcatcgcatgtgtgagtaggtgtcatttctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaaggggg
 aggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaGCGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA
 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCGACCAAAGG
 TCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC
 TGCCTGCAGG (配列番号83)

【0676】

< 上記実施例5の配列 >

ITRドナーDNA構築物の配列(5'および3'逆位gRNA部位に挟まれていないドナ
 ーDNA__p1547)

【0677】

5' ITR

【0678】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGAC
 CTTTGGTTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAACT
 CCATCACTAGGGGTTCT (配列番号110)

【0679】

追加のaav配列

【0680】

20

Gctagtgctagc (配列番号84)

【0681】

SAS (スライシングアクセプターシグナル)

【0682】

Gataggcacctattggtcttactgacatccactttgcctttctctccacag (配列番号21)

【0683】

マウスアルブミンエキソン14

【0684】

ggtccaaaccttgtcactagatgcaaagacgccttagcc (配列番号22)

【0685】

30

T2A配列

【0686】

Ggaagcggagagggcagaggaagtctgctaacatgcggtgacgtcgaggagaatcctggacct (配
 列番号23)

【0687】

Ds-Redコード配列

【0688】

Atggatagcactgagaacgtcatcaagcccttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaa
 cggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcaagccctacgagggcaccagaccgcca
 agctgcaggtgaccaagggcgggccccctgcccttcgctgggacatcctgtccccccagttccagtac
 ggctccaaggtgtacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactacaagaagctgtccttccccgagg
 gcttcaagtgaggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgaccaggaactcctc
 cctgcaggacggcaccttcatctaccacgtgaagttcatcggcgtgaacttccccctccgacggccccg
 taatgcagaagaagactctgggctgggagccctccaccgagcgcctgtacccccgcgacggcgtgct
 gaagggcgagatccacaagggcgtgaagctgaagggcggcggcactacctggtggagtccaagtc
 aatctacatggccaagaagcccgtgaagctgcccggctactactacgtggactccaagctggacatca
 cctcccacaacgaggactacaccgtggtggagcagtagcagcgcgcccaggccccgccaccacctgtt
 ccagtag

40

【0689】

WPRE配列

50

【 0 6 9 0 】

Aatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactgggtattcttaactatgttgctccttttacgct
 atgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcctt
 gtataaatcctgggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtg
 cactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctcctttccggggac
 tttcgtttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttgcccgtgctggacagg
 ggctcggctgttgggcactgacaattccgtgggtgttgcgggaaatcatcgtcctttccttggtgct
 cgctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctaagtccttccggccctcaatccagc
 ggacctccttcccggcgtgctgcccggctctgcccgtccttccgcgtcttcg

10

【 0 6 9 1 】

B G H ポリ A

【 0 6 9 2 】

GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCT
 TCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT
 TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA (配列番号26)

【 0 6 9 3 】

追加の A A V 配列

【 0 6 9 4 】

Agagctcttgtcggaggtcgacatttaaataagggcggaattcaattt (配列番号85)

20

【 0 6 9 5 】

U 6 発現カセット

【 0 6 9 6 】

Gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgttagagagataattgga
 attaatgtactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttggg
 tagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttca
 tttcttggctttatatacttgtgaaaggacgaaacaccgtatttaataaggcagcagtggttttagagc
 tagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcgggtgctt
 tttgt (配列番号86)

30

【 0 6 9 7 】

追加の A A V 配列

【 0 6 9 8 】

Tttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtccgttttttagcgcgtgcccgaattctgcagac
 aatggctctagaggtaccaattg (配列番号87)

【 0 6 9 9 】

3 ' I T R 配列

【 0 7 0 0 】

Aggaaccctagtgatggagttggccactccctctctgcgctcgctcactgaggccggggcga
 ccaaaggtcgcccagcggcggttggccggggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagcgt (配
 列番号29)

40

【 0 7 0 1 】

全配列 __ p 1 5 4 7

【 0 7 0 2 】

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGAC
 CTTTGGTGCCTCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC
 CCATCACTAGGGGTTCT

gctagtgtagcgtataggcacctattggtcttactgacatccactttgcctttctctccacaggggtcaa
 acctgtcactagatgcaaagacgccttagccggaagcggagagggcagaggaagtctgctaactg
 cgggtgacgtcgaggagaatcctggacctatggatagcactgagaacgtcatcaagcccttcatgct
 tcaagggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcgaggggcaggggcgagggca

50

agccctacgagggcaccagaccgccaagctgcaggtgaccaagggcggccccctgcccttcgcctg
ggacatcctgtccccccagttccagtacggctccaaggtgtacgtgaagcaccgccgacatccccg
actacaagaagctgtccttccccgagggcctcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcgg
cgtgggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcaccttcatctaccacgtgaagttcatcg
gCGTgaacttccccctccgacggccccgtaatgcagaagaagactctgggctgggagccctccaccga
gCGcctgtacccccgCGacggcgtgctgaagggcGagatccacaagggcgtgaagctgaagggcgg
cggccactacctggtggagttcaagtcaatctacatggccaagaagcccgtgaagctgcccggctact
actacgtggactccaagctggacatcacctcccacaacgaggactacaccgtgggtggagcagtacga
gCGcGCCgaggccccGCCaccacctgttccagtaggatccaatcaacctctggattacaaaatttgtga
aagattgactgggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgt
atcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatg
aggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgtttctgacgcaacccccact
ggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcctttccccctccctattgccacgg
cggaaactcatcGCCgCctgCcttGCCgCtGctggacaggggctcggcgtgttgggcaactgacaattcc
gtgggtgttgcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttggcacctggattctgCGcG
ggacgtccttctgctacgtcccttCGGCCctcaatccagCGgaccttccctccCGcggcctgctgCGgG
ctctgCGgCctcttccCGcgtcttccGagatctGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC
TGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGT
CCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTA
TTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC
AGGCATGCTGGGGagagctcttgtcagagtcgacatttaaatgaagggcgaattcaatttgaggg
cctatttcccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgttagagagataattggaattaatt
tgactgtaaacacaaagatattagtaaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttg
cagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaggtatttgcatttcttg
gctttatataatcttgtggaaaggacgaaacaccgtatttaataggcagcagtggttttagagctagaaa
tagcaagttaaaataaggctagtcCGttatcaacttgaaaagtgGCaccgagtcgggtgctttttgttt
tagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcCGtttttagCGcgtgCGccaattctgCagaca
aatggctctagaggtaccaattgaggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgCGcGctc
gctcGctcactgaggccgggCGaccaaaggtcGcccGacGcccgggctttgcccgggCGgCctcagT
gagCGagCGagCGcGcagT (配列番号88)

10

20

30

【 0 7 0 3 】

参考文献

[1] Cong, L., et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013. 339(6121): p. 819-23.

[2] Jiang, W., et al., RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013. 31(3): p. 233-9.

[3] Tu, Z., et al., CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*, 2015. 10: p. 35.

[4] Nishiyama, J., T. Mikuni, and R. Yasuda, Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. *Neuron*, 2017. 96(4): p. 755-768 e5.

[5] Anguela, X.M., et al., Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood*, 2013. 122(19): p. 3283-7.

[6] Barzel, A., et al., Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice. *Nature*, 2015. 517(7534): p. 360-4.

[7] Li, H., et al., In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 2011. 475(7355): p. 217-21.

[8] Sharma, R., et al., In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy. *Blood*, 2015. 126(15): p. 177

40

50

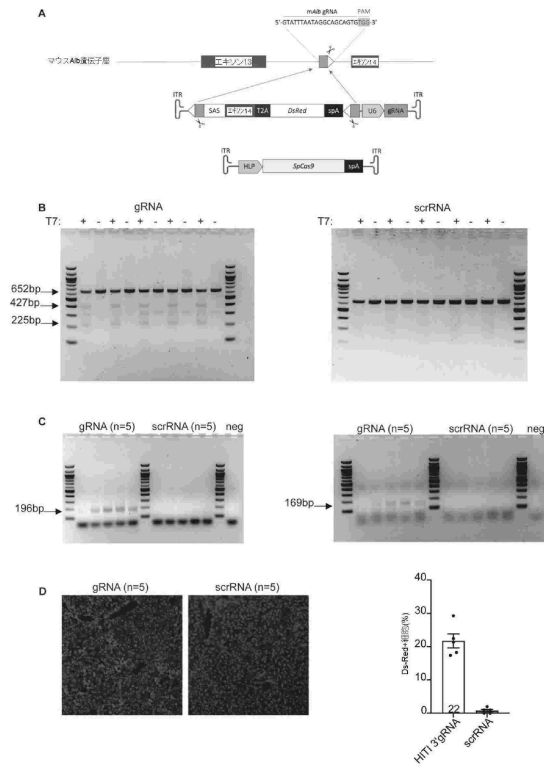
7-84.

- [9] Bakondi, B., In vivo versus ex vivo CRISPR therapies for retinal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol*, 2016. 11(6): p. 397-400.
- [10] Lackner, D.H., et al., A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 10237.
- [11] Suzuki, K., et al., In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016. 540(7631): p. 144-149.
- [12] Brunetti-Pierri N, A.A., Gene Therapy of Human Inherited Diseases, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, S. R, Editor. 2010, McGraw Hill: New York. 10
- [13] Ehrhardt, A., H. Xu, and M.A. Kay, Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7689-95.
- [14] E Neufeld, J.M., The mucopolysaccharidoses, in *The mucopolysaccharidoses*, A.B. CR Scriver, WS Sly, DM Valle, Editor. 2001, McGraw-Hill: New York (2001). p. 3421-3452.
- [15] Cotugno, G., et al., Impact of age at administration, lysosomal storage, and transgene regulatory elements on AAV2/8-mediated rat liver transduction. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e33286. 20
- [16] Ferla, R., et al., Similar therapeutic efficacy between a single administration of gene therapy and multiple administrations of recombinant enzyme in a mouse model of lysosomal storage disease. *Hum Gene Ther*, 2014. 25(7): p. 609-18.
- [17] Ferla, R., et al., Gene therapy for mucopolysaccharidosis type VI is effective in cats without pre-existing immunity to AAV8. *Hum Gene Ther*, 2013. 24(2): p. 163-9.
- [18] Tessitore, A., et al., Biochemical, pathological, and skeletal improvement of mucopolysaccharidosis VI after gene transfer to liver but not to muscle. *Mol Ther*, 2008. 16(1): p. 30-7. 30
- [19] Alliegro, M., et al., Low-dose Gene Therapy Reduces the Frequency of Enzyme Replacement Therapy in a Mouse Model of Lysosomal Storage Disease. *Mol Ther*, 2016. 24(12): p. 2054-2063.
- [20] Ferla, R., et al., Non-clinical Safety and Efficacy of an AAV2/8 Vector Administered Intravenously for Treatment of Mucopolysaccharidosis Type VI. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2017. 6: p. 143-158.
- [21] Cotugno, G., et al., Long-term amelioration of feline Mucopolysaccharidosis VI after AAV-mediated liver gene transfer. *Mol Ther*, 2011. 19(3): p. 461-9.
- [22] Giugliani, R., et al., Natural history and galsulfase treatment in mucopolysaccharidosis VI (MPS VI, Maroteaux-Lamy syndrome)-10-year follow-up of patients who previously participated in an MPS VI Survey Study. *Am J Med Genet A*, 2014. 164A(8): p. 1953-64. 40
- [23] Desnick, R.J. and E.H. Schuchman, Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2012. 13: p. 307-35.
- [24] Neufeld, E.F., Lysosomal storage diseases. *Annu Rev Biochem*, 1991. 60: p. 257-80.
- [25] Bowen, D.J., Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol*, 2002. 55(2): p.127-44. Antonarakis, S.E., et al., Molecular 50

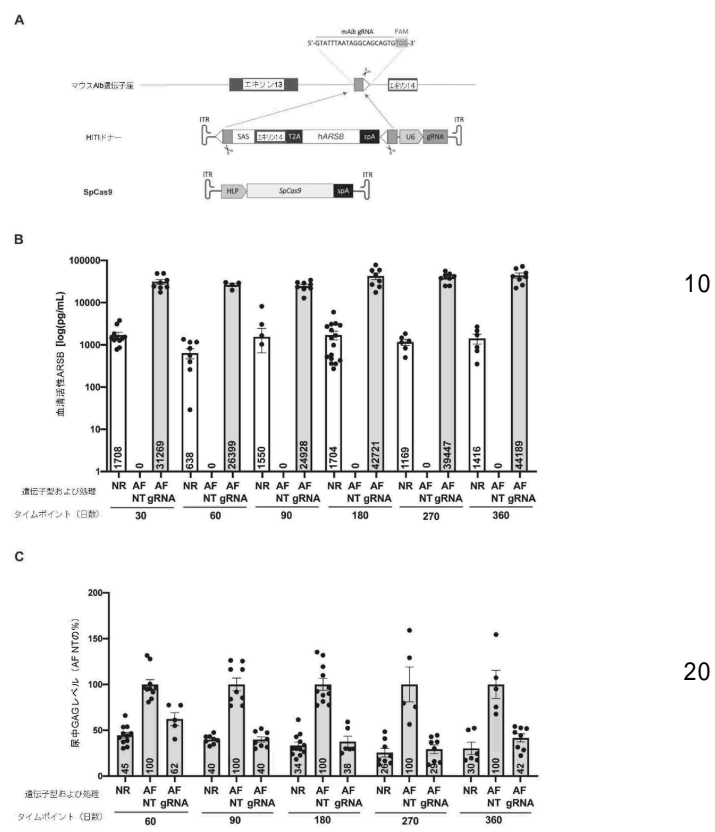
- etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 386: p. 19-34
- [26] Bunting, S., et al., Gene Therapy with BMN 270 Results in Therapeutic Levels of FVIII in Mice and Primates and Normalization of Bleeding in Hemophilic Mice. *Mol Ther*, 2018. 26(2): p. 496-509
- [27] Rangarajan, S., et al., AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med*, 2017. 377(26): p. 2519-2530
- [28] Makris, M. Gene therapy 10 in haemophilia: effective and safe, but with many uncertainties. *The Lancet Haematology* (2020) doi:10.1016/S2352-3026(20)30035-1 10
- [29] Grieger, J. C. et al., Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Serotypes: Impact of Larger Genomes on Infectivity and Postentry Steps. *J. Virol.* (2005)
- [30] Dong, B. et al., Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol. Ther.* (2010)
- [31] Hirsch, M. et al., Little vector, big gene transduction: Fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Molecular Therapy* (2010)
- [32] Wu, Z. et al., Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol. Ther.* (2010)
- [33] McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, Lee D, Rabbanian S, Raj D, Patel N, Tuddenham EG, Christophe OD, McVey JH, Waddington S, Nienhuis AW, Gray JT, Fagone P, Mingozzi F, Zhou SZ, High KA, Cancio M, Ng CY, Zhou J, Morton CL, Davidoff AM, Nathwani AC. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3335-44. doi: 10.1182/blood-2012-10-462200. Epub 2013 Feb 20. PMID: 23426947; PMCID: PMC3637010. 20
- [34] Doria, M., A. Ferrara, and A. Auricchio, AAV2/8 vectors purified from culture medium with a simple and rapid protocol transduce murine liver, muscle, and retina efficiently. *Hum Gene Ther Methods*, 2013. 24 (6): p. 392-8. 30
- [35] Ferla R, Claudiani P, Cotugno G, Saccone P, De Leonibus E, Auricchio A. Similar therapeutic efficacy between a single administration of gene therapy and multiple administrations of recombinant enzyme in a mouse model of lysosomal storage disease. *Hum Gene Ther*. 2014;25(7):609-618. doi:10.1089/hum.2013.213
- [36] Harmatz PR, Shediak R. Mucopolysaccharidosis VI: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Front Biosci - Landmark*. 2017;22(3):385-406. doi:10.2741/4490
- [37] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*. 2002 Apr 15;16(8):948-58. doi: 10.1101/gad.981002. PMID: 11959843; PMCID: PMC152352. 40
- [38] Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol*. 2002 May;20(5):505-8. doi: 10.1038/nbt0502-505. PMID: 11981566.
- [39] Drittanti, L., et al., High throughput production, screening and analysis of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther*, 2000. 7(11): p. 924-9.

【 図 面 】

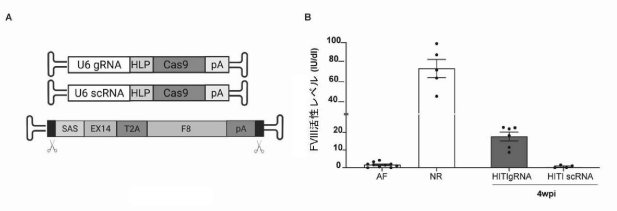
【 図 1 】



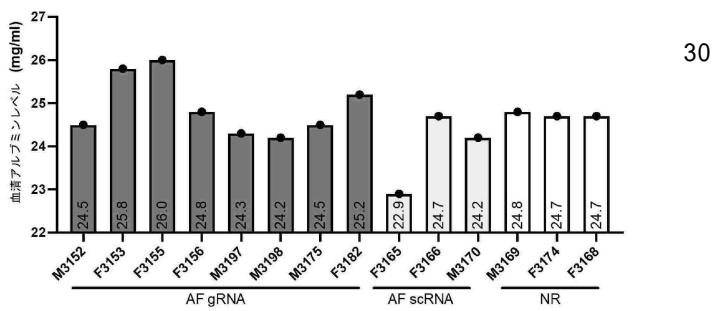
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



10

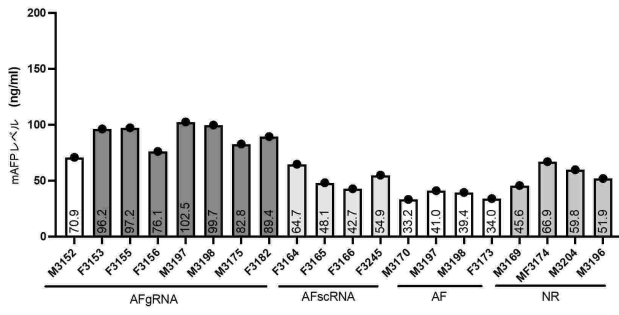
20

30

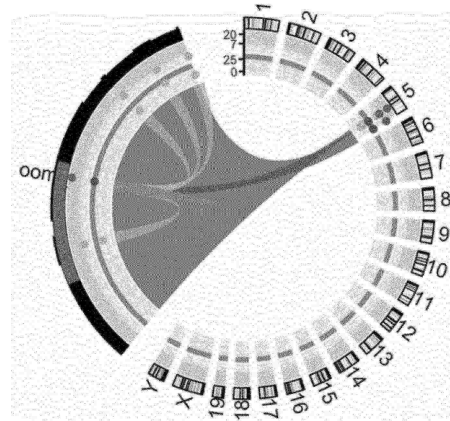
40

50

【 5 】

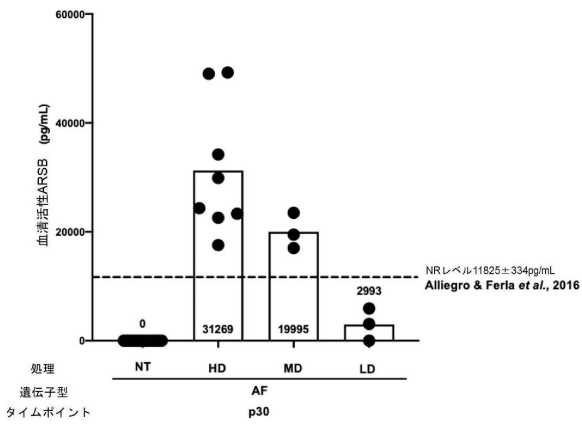


【 6 】

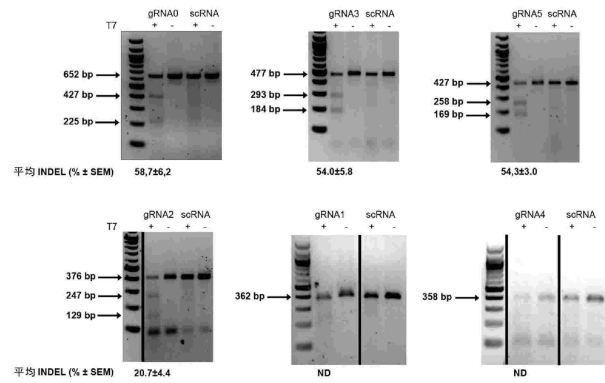


10

【 7 】



【 8 】



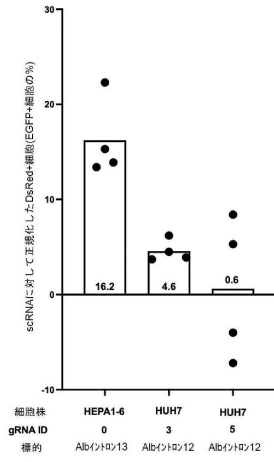
20

30

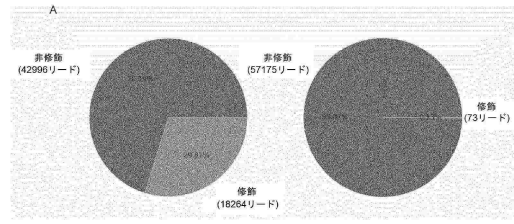
40

50

【 図 9 】

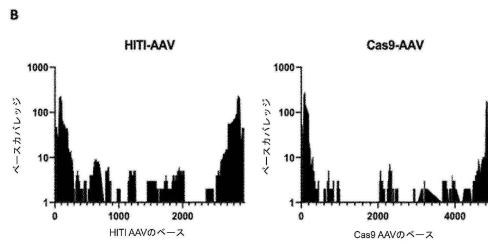


【 図 10 A 】

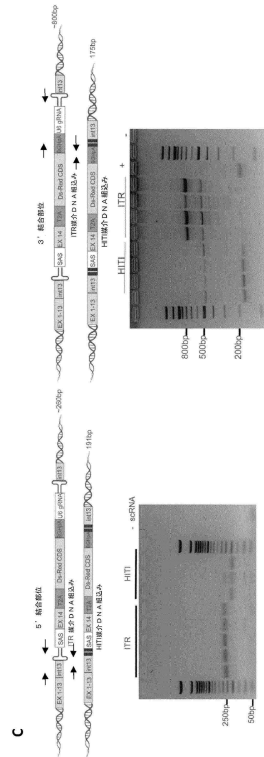


10

【 図 10 B 】



【 図 10 C 】



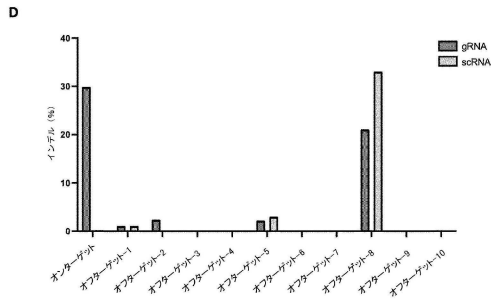
20

30

40

50

【 図 10 D 】



10

【 配列表 】

2025515030000001.xml

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/061582

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: <ul style="list-style-type: none"> a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed. b. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K48/00 C12N15/11 C12N15/90		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112 741 906 A (UNIV EAST CHINA NORMAL; BIORAY LABORATORIES INC) 4 May 2021 (2021-05-04)	1-6, 9-36, 38
Y	the whole document	7, 8, 37
Y	WO 2020/079033 A1 (FOND TELETHON [IT]) 23 April 2020 (2020-04-23) cited in the application page 2, lines 14-17 page 4, lines 17-20 page 10, lines 28-29	7, 37
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2023	Date of mailing of the international search report 30/08/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Knudsen, Henrik	

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/061582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 112741906	A	04-05-2021	NONE

WO 2020079033	A1	23-04-2020	CA 3116452 A1 23-04-2020
			CN 113348247 A 03-09-2021
			EP 3867375 A1 25-08-2021
			JP 2022505139 A 14-01-2022
			US 2022001030 A1 06-01-2022
			WO 2020079033 A1 23-04-2020

CN 113058041	A	02-07-2021	NONE

WO 2020206162	A1	08-10-2020	AU 2020256225 A1 02-09-2021
			BR 112021019512 A2 15-02-2022
			CA 3133361 A1 08-10-2020
			CL 2021002534 A1 29-04-2022
			CN 113727603 A 30-11-2021
			CO 2021012676 A2 20-10-2021
			EP 3945800 A1 09-02-2022
			IL 286865 A 31-10-2021
			JP 2022527809 A 06-06-2022
			KR 20210148154 A 07-12-2021
			SG 11202108451V A 29-09-2021
			US 2020318136 A1 08-10-2020
			WO 2020206162 A1 08-10-2020

WO 2018013932	A1	18-01-2018	AU 2017295898 A1 21-02-2019
			CA 3030587 A1 18-01-2018
			EP 3485023 A1 22-05-2019
			JP 2019524098 A 05-09-2019
			JP 2023092453 A 03-07-2023
			US 2019225991 A1 25-07-2019
			WO 2018013932 A1 18-01-2018

WO 2014011237	A1	16-01-2014	AU 2013289206 A1 15-01-2015
			CA 2875618 A1 16-01-2014
			DK 2872625 T3 06-02-2017
			DK 3196301 T3 14-01-2019
			DK 3444342 T3 24-08-2020
			EP 2872625 A1 20-05-2015
			EP 3196301 A1 26-07-2017
			EP 3444342 A1 20-02-2019
			EP 3816281 A1 05-05-2021
			ES 2613691 T3 25-05-2017
			ES 2697912 T3 29-01-2019
			ES 2813080 T3 22-03-2021
			HK 1209788 A1 08-04-2016
			HU E030799 T2 28-06-2017
			HU E041553 T2 28-05-2019
			HU E051612 T2 01-03-2021
			JP 6225182 B2 01-11-2017
			JP 6587666 B2 09-10-2019
			JP 7218401 B2 06-02-2023
			JP 2015527881 A 24-09-2015
			JP 2018038410 A 15-03-2018
			JP 2019201672 A 28-11-2019
			JP 2021168669 A 28-10-2021
			JP 2023038332 A 16-03-2023
			US 2014017212 A1 16-01-2014

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/061582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2014112896 A1	24-04-2014
		US 2018110808 A1	26-04-2018
		US 2018214490 A1	02-08-2018
		US 2019224246 A1	25-07-2019
		US 2022331447 A1	20-10-2022
		WO 2014011237 A1	16-01-2014

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/711(2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 35/761(2015.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 9/127(2025.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 9/1273(2025.01)	A 6 1 K 9/1273	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア ヴァレーゼ 1 6 ビー, フォンダジオン テレソン イーティーエス

(72)発明者 フェルラ, リタ

イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア ヴァレーゼ 1 6 ビー, フォンダジオン テレソン イーティーエス

(72)発明者 リヤド サンタエウラリア, マネル

イタリア国, 0 0 1 8 5 ローマ, ヴィア ヴァレーゼ 1 6 ビー, フォンダジオン テレソン イーティーエス

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95X AB01 BA01 CA24 CA44
 4C076 AA19 AA65 AA95 BB13 CC10 CC11 CC14 CC16 CC21 FF70
 4C084 AA13 MA24 MA38 MA66 NA13 NA14 ZA33 ZA36 ZA53 ZA75
 ZC21 ZC33 ZC35
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA24 MA38 MA66
 NA13 NA14 ZA33 ZA36 ZA53 ZA75 ZC21 ZC33 ZC35
 4C087 AA01 AA02 BB63 BC83 CA12 MA24 MA38 MA66 NA13 NA14
 ZA33 ZA36 ZA53 ZA75 ZC21 ZC33 ZC35